

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

---

**Alteraciones en la homeostasis de  
calcio y estrés oxidativo en neuronas  
deficientes en la esfingomielinasa ácida.  
Implicaciones en la enfermedad  
de Niemann Pick de tipo A.**

---

Tesis Doctoral

**Azucena Pérez Cañamás**

Madrid 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Alteraciones en la homeostasis de calcio y estrés oxidativo en neuronas deficientes en la esfingomielinasa ácida. Implicaciones en la enfermedad de Niemann Pick de tipo A.

Memoria presentada por Azucena Pérez Cañamás, Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología (Biociencias Moleculares) por la Universidad Autónoma de Madrid.

Directora:

M<sup>a</sup> Dolores Ledesma Muñoz

Este trabajo ha sido realizado en el “Centro de Biología Molecular Severo Ochoa” (CSIC-UAM).



La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio de la Dra. José M<sup>a</sup> Dolores Ledesma Muñoz, en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).



La doctora M<sup>a</sup> Dolores Ledesma, Científico titular del CSIC y directora de esta Tesis Doctoral,

Hace constar:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “Alteraciones en la homeostasis de calcio y estrés oxidativo en neuronas deficientes en la esfingomielinasa ácida. Implicaciones en la enfermedad de Niemann Pick de tipo A” ha sido realizado por Azucena Pérez Cañamás bajo su dirección y supervisión, dentro del programa de Doctorado en Biociencias Moleculares del Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Por reunir los requisitos de rigor científico, innovación y correcta aplicación metodológica, da su Visto Bueno a la presentación de dicha Tesis Doctoral.

Madrid, a 8 de mayo de 2015





# Índice general

Abreviaturas	v
Resumen	vii
Abstract	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. La esfingomielina, más que un simple componente estructural de membrana . . . . .	1
1.1.1. Los esfingolípidos . . . . .	1
1.1.2. La SM y sus funciones . . . . .	2
1.1.3. La síntesis de la SM . . . . .	3
1.1.4. El catabolismo de la SM . . . . .	4
1.2. La enfermedad de Niemann Pick tipo A . . . . .	6
1.2.1. Causas de la NPA . . . . .	6
1.2.2. Modelo de ratón para NPA . . . . .	7
1.2.3. Estrategias terapéuticas para NPA . . . . .	8
1.3. Enfermedades de depósito lisosomal (LSDs) . . . . .	9
1.3.1. El lisosoma . . . . .	9
1.3.2. Clasificación de las LSDs . . . . .	10
1.3.3. Mecanismos patológicos en las LSDs . . . . .	11
1.4. La regulación de calcio intracelular . . . . .	12
1.4.1. Mecanismos de regulación de calcio . . . . .	12
1.4.2. Alteraciones en la regulación de calcio en LSDs . . . . .	16
1.5. Estrés oxidativo . . . . .	17
1.5.1. Tipos de radicales libres y sus derivados . . . . .	17
1.5.2. Mecanismos de formación y eliminación de especies reactivas. Mantenimiento del equilibrio redox . . . . .	17
1.5.3. El estrés oxidativo en LSDs . . . . .	19
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1. Anticuerpos . . . . .	23
3.2. Muestras de pacientes . . . . .	23
3.3. Ratones . . . . .	24
3.3.1. Características y mantenimiento . . . . .	24
3.3.2. Genotipado mediante PCR . . . . .	25
3.3.3. Sacrificio de ratones, disección y tratamiento del tejido . . . . .	26
3.4. Cultivos primarios de neuronas hipocampales . . . . .	27
3.4.1. Tratamientos en neuronas en cultivo . . . . .	27
3.5. Ensayos bioquímicos . . . . .	28
3.5.1. Preparación de extractos de membrana . . . . .	28
3.5.2. Determinación de la concentración de proteínas . . . . .	28
3.5.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot) . . . . .	29
3.5.4. Cuantificación de lípidos . . . . .	29
3.5.5. Medida de actividad PMCA . . . . .	31
3.5.6. Aislamiento de rafts lipídicos . . . . .	32
3.6. Análisis por microscopía . . . . .	33
3.6.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en muestras humanas . . . . .	33
3.6.2. Inmunofluorescencia en neuronas en cultivo . . . . .	34
3.6.3. Inmunofluorescencia en rodajas de hipocampo de 400 $\mu\text{m}$ . . . . .	35
3.6.4. Inmunofluorescencia en cortes de cerebelo . . . . .	35
3.7. Registro de los niveles de calcio . . . . .	35
3.8. Tratamiento de los ratones con SAHA . . . . .	36
3.9. Tests de comportamiento . . . . .	36
3.9.1. Tests de coordinación motora: Rotarod . . . . .	37
3.9.2. Tests de memoria y aprendizaje: Prueba de la Y (Y-maze) . . . . .	37
3.10. Análisis Estadístico . . . . .	37
3.10.1. Comparaciones simples . . . . .	37
3.10.2. Comparaciones múltiples . . . . .	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1. El estrés oxidativo caracteriza el hipocampo de pacientes de NPA y de ratones ASM-/- que son modelo para la enfermedad. . . . .	39
4.1.1. Neurodegeneración masiva y acumulación de gránulos de lipofusina en el cerebro de un paciente de NPA. . . . .	39
4.1.2. Las neuronas de ratones ASM-/- presentan gránulos de lipofusina debido a la acumulación de SM. . . . .	41
4.1.3. Las neuronas ASM-/- presentan altos niveles de ROS debido al incremento de SM. . . . .	44
4.2. Mecanismo molecular: la deficiente actividad de PMCA que altera la homeostasis del calcio causa el estrés oxidativo en neuronas ASM-/- . . . . .	46

4.2.1.	El aumento de los niveles de ROS en neuronas ASM-/- se debe al incremento del calcio intracelular. . . . .	46
4.2.2.	La deficiente actividad de la calcio-ATPasa de membrana (PMCA) es la responsable del aumento de calcio intracelular y el estrés oxidativo en las neuronas ASM-/-. . . . .	51
4.2.3.	2.3. La pérdida de actividad de PMCA en neuronas ASM-/- se debe al aumento de SM en la membrana plasmática . . . .	55
4.3.	Prevención del estrés oxidativo y la muerte neuronal mediante el uso de un inhibidor de las deacetilasas de histonas (HDACi) . . . . .	58
4.3.1.	El ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA o vorinostat) aumenta los niveles de PMCA y protege frente al estrés oxidativo mediado por el aumento de SM en neuronas en cultivo . . . .	58
4.3.2.	El tratamiento oral con SAHA induce la expresión de PMCA en el cerebro de ratones ASM-/- . . . . .	61
4.3.3.	El tratamiento oral con SAHA previene el estrés oxidativo y la muerte neuronal en ratones ASM-/- . . . . .	63
4.3.4.	El tratamiento oral con SAHA previene los déficits de memoria espacial y motores en los ratones ASM-/- . . . . .	65
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
5.1.	El estrés oxidativo y su especial impacto en neuronas . . . . .	71
5.2.	Las alteraciones en la homeostasis de calcio son un mecanismo patológico común en las LSDs . . . . .	73
5.3.	La SM como regulador de la homeostasis de calcio neuronal a través de la PMCA . . . . .	74
5.4.	PMCA y neurodegeneración . . . . .	75
5.5.	Hacia una terapia para NPA . . . . .	77
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>83</b>
	<b>Anexo: Publicaciones</b>	<b>103</b>



# Abreviaturas

**AG:** Ácido graso

**AMPA:** Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

**ASM:** Esfingomielinasa ácida

**CA1:** Cornu ammon 1 (región del hipocampo)

**CA3:** Cornu ammon 3 (región del hipocampo)

**CaM:** Calmodulina

**CoA:** Coenzima A

**DAG:** Diacilglicerol

**DHR:** Dihidrorodamina-123

**DRM:** Membranas resistentes a detergentes

**GSH:** Glutatión

**HDAC:** Histona deacetilasas

**HDACi:** Inhibidor de histona deacetilasas

**HO $\cdot$ :** Radical hidroxilo

**HOP- $\beta$ -CD:** Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

**IP3R:** Receptor de inositol trifosfato

**LSD:** Enfermedad de depósito lisosomal

**MAP2:** Proteína asociada a microtúbulos 2

**nAChR:** Receptor nicotínico de acetilcolina

**NCX:** Intercambiador de calcio-sodio

**NMDAR:** N-metil-D-aspartato

**NO $\cdot$ :** Óxido nítrico

**NOS:** Óxido nítrico sintasa

**NPA:** Enfermedad de Niemann Pick tipo A

**NPB:** Enfermedad de Niemann Pick tipo B

**NSM:** Esfingomielinasa neutral

**O<sub>2</sub> $\cdot^-$ :** Radical superóxido

**ONOO $^-$ :** Peroxinitrito

**PIP2:** Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PMCA:** Calcio-ATPasa de membrana plasmática

**RE:** Retículo endoplasmático

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno

**RNS:** Especies reactivas del nitrógeno

**RyR:** Receptor rianodine

**SAHA:** Ácido hidroxámico suberoilánilida o Vorinostat

**SM:** Esfingomielina

**SMS:** Esfingomielina sintasa

**SMPD:** Esfingomielina fosfodiesterasa

**SOD:** Superóxido dismutasa

**TrkB:** Receptor de tirosina quinasa B

**VGCC:** Canales de calcio dependientes de voltaje

# Resumen

La esfingomielinina (SM) es el esfingolípido más abundante que está especialmente enriquecido en las membranas de las neuronas. Su importancia en la fisiología neuronal se pone de manifiesto en las graves alteraciones neurológicas que caracterizan enfermedades donde los niveles de este lípido están alterados. Este es el caso de la enfermedad de Niemann Pick tipo A (NPA), provocada por mutaciones en el gen que codifica para la esfingomielinasa ácida (ASM) conduciendo a la acumulación de SM en los lisosomas y en la membrana plasmática.

La NPA pertenece al grupo de enfermedades de depósito lisosomal (LSDs). A pesar de la naturaleza diferente de los sustratos que se acumulan en las LSDs, éstas comparten características patológicas y clínicas. En este trabajo de tesis hemos caracterizado dos de las vías patológicas comunes a varias LSDs que no habían sido exploradas en la NPA: la homeostasis de calcio y el estrés oxidativo.

Nuestros resultados demuestran que el estrés oxidativo es una característica patológica en cerebros de pacientes de NPA y de ratones carentes de ASM (ASM-/-) que son modelo para la enfermedad. El análisis de las neuronas de estos últimos nos ha permitido determinar que el incremento de los niveles de calcio intracelular es el responsable de la aparición del estrés oxidativo. A su vez, el aumento de calcio es consecuencia de la acumulación de SM en la membrana plasmática que reduce la actividad de la ATPasa de calcio de membrana, PMCA.

Esta información nos llevó a ensayar *in vitro* e *in vivo* una estrategia farmacológica para evitar estas anomalías basada en el uso de un inhibidor de deacetilasas de histonas, SAHA, con demostrada capacidad para aumentar los niveles de PMCA y activar la extrusión de calcio en un modelo celular de cáncer de mama. El tratamiento oral con SAHA en ratones ASM-/- consiguió aumentar los niveles de proteína PMCA en cerebro, prevenir el estrés oxidativo y la neurodegeneración y mejorar su memoria y su coordinación motora.

Consideramos que estos resultados revelan un nuevo papel de la SM en la regulación de la homeostasis del calcio neuronal y el estrés oxidativo. Además, identifican un nuevo mecanismo patológico en NPA abriendo perspectivas terapéuticas para esta enfermedad hoy en día incurable.





# Abstract

Sphingomyelin (SM) is the most abundant sphingolipid, which is specially enriched in neuronal membranes. The severe neurological alterations that suffer patients of different diseases in which the levels of SM are altered reinforce the relevant role of this lipid in neuronal physiology. One of this diseases is Niemann Pick disease type A (NPA), which is caused by mutations in the gene that encodes for acid sphingomyelinase (ASM), promoting SM accumulation in the lysosomes and in the plasma membrane.

NPA is classified as a lysosomal storage disorder (LSD). Despite the distinctive types of substrates that accumulate in LSDs they share common pathological and clinical features. In this PhD work we have characterized two pathological pathways that are common to many LSDs but have not been explored in NPA: alterations in calcium homeostasis and oxidative stress.

The results obtained demonstrate that oxidative stress is a hallmark in the brain of NPA patients and of the mouse model of the disease, the ASM knockout mice (ASM<sup>-/-</sup>). Analyzing ASM<sup>-/-</sup> hippocampal neurons we have determined that the increase in basal calcium levels causes the appearance of oxidative stress. In turn, calcium increase is a consequence of SM accumulation in the plasma membrane that reduces the activity of the plasma membrane calcium-ATPase (PMCA).

Using a pharmacological strategy *in vitro* and *in vivo* we have been able to prevent these anomalies. This strategy is based in the use of SAHA, a histone deacetylase inhibitor that was shown to increase PMCA levels and to enhance calcium clearance in a breast cancer cell model. Oral treatment of ASM<sup>-/-</sup> mice with SAHA increased PMCA levels in the brain, prevented oxidative stress and neurodegeneration, and improved memory and motor coordination.

Taken together, these results unveil the role of SM in the regulation of neuronal calcium homeostasis and oxidative stress. Moreover, they identify a novel pathological mechanism in NPA, opening therapeutical perspectives for this currently untreatable disease.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La esfingomielina, más que un simple componente estructural de membrana

Los lípidos conforman un grupo numeroso y heterogéneo de moléculas orgánicas de origen biológico compuestas principalmente de carbono e hidrógeno y en menor medida de oxígeno, fósforo, nitrógeno y azufre. En su inmensa mayoría los lípidos poseen una parte hidrofóbica y otra hidrofílica que les confiere un carácter anfipático. Esta característica permite que las partes hidrofóbicas tiendan a asociarse entre sí mientras que las porciones hidrofílicas pueden exponerse a ambientes acuosos. El ordenamiento espontáneo de las colas hidrofóbicas y las cabezas hidrofílicas establece una bicapa que conforma la membrana plasmática que aísla el interior de las células del medio extracelular.

Los lípidos se pueden clasificar atendiendo a diferentes características de su composición pero de manera general pueden dividirse en lípidos “simples” y “complejos”. Los lípidos simples (como los ácidos grasos, esteroides y acilglicerol) generan al hidrolizarse dos productos como máximo mientras que la hidrólisis de los complejos (como los glicerofosfolípidos y glicosfingolípidos) genera tres o más productos.

Debido a su enriquecimiento en las membranas celulares, sobre todo las neuronales, a su diversidad de funciones y a su protagonismo en esta tesis dedicaremos especial atención a los esfingolípidos y en particular al más abundante de ellos: la esfingomielina (SM).

### 1.1.1. Los esfingolípidos

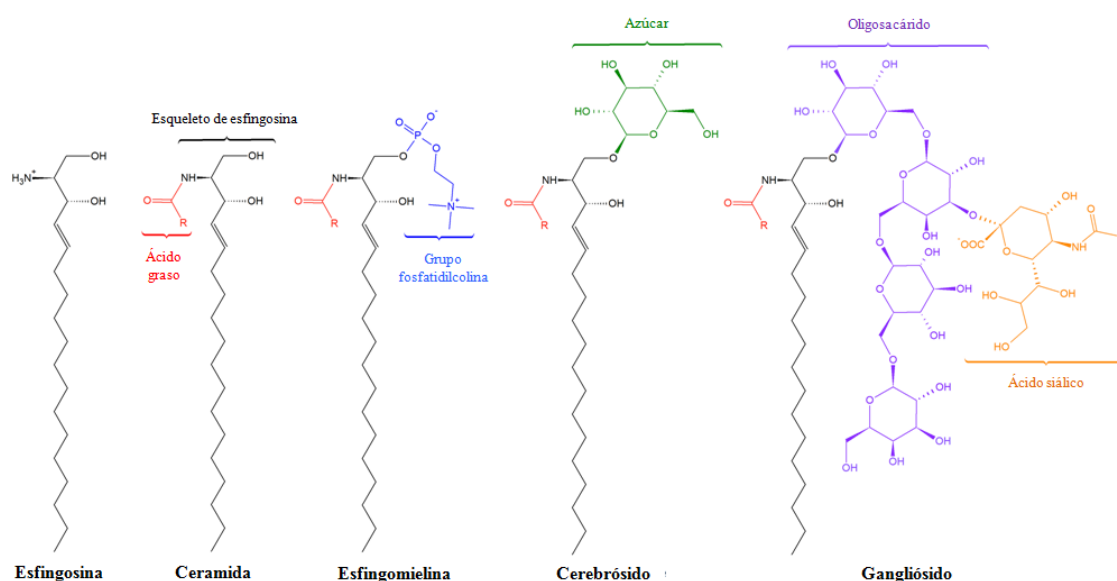
Los esfingolípidos son una familia compleja de compuestos que presentan una característica estructural común: un esqueleto de esfingosina sintetizado *de novo* a partir de serina y el ácido graso (AG) de cadena larga palmitoil-CoA. A partir de esta base se forman posteriormente ceramidas, fosfoesfingolípidos y glucoesfingolípidos (Merrill Jr. y Sandhoff, 2002).

Las ceramidas son los esfingolípidos más simples con un ácido graso unido a la base de esfingosina mediante enlace amida. Son, a su vez, precursoras de los fosfoesfingolípidos y glucoesfingolípidos que presentan además un grupo fosfato o

carbohidrato, respectivamente.

En los glucoesfingolípidos el carbohidrato unido a la ceramida puede ser un monosacárido o un oligosacárido. En este grupo encontramos los cerebrósidos, con grupos cabeza que presentan un solo residuo de azúcar. Los más prevalentes son los galactocerebrósidos que unen galactosa y los glucocerebrósidos que unen glucosa (Ishibashi et al., 2013). También se clasifican en este grupo los gangliósidos que presentan grandes cabezas polares cargadas negativamente formadas por oligosacáridos y por al menos un residuo de ácido siálico (Sandhoff and Harzer, 2013).

Entre los fosfoesfingolípidos, el más abundante en mamíferos es la esfingomielina (SM), en la que el grupo hidrofílico que se une a la ceramida es la fosforilcolina (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Estructura de los diferentes esfingolípidos.** La esfingosina es el componente estructural base de los esfingolípidos. La unión de un AG a ésta produce ceramida. La esfingomielina es un fosfoesfingolípidos con un grupo fosfocolina como cabeza polar. Cerebrósidos y gangliósidos son glucoesfingolípidos con un monosacárido o un oligosacárido más ácido siálico como grupo polar, respectivamente.

### 1.1.2. La SM y sus funciones

La SM, como el resto de esfingolípidos, tiene un importante papel como **componente estructural** de las membranas biológicas. Es uno de los esfingolípidos más restringidos espacialmente ya que el gran tamaño de su cabeza polar impide su paso de una cara a otra de la membrana (*flipping*). Sin la ayuda de flipasas específicas, la localización de la SM se limita a la cara de la membrana donde se genera: la cara luminal del aparato de Golgi o la cara externa de la membrana plasmática.

Las dos cadenas de ácidos grasos que componen la SM pueden tener distinta longitud lo que le proporciona una asimetría gracias a la cual modula la curvatura de la membrana y la interdigitación entre sus dos capas y por tanto la fluidez. Estas características hacen a las uniones entre moléculas de SM más abundantes y estables además de permitir que moléculas de colesterol se intercalen formándose así los dominios de membrana llamados **rafts o balsas lipídicas** (Lingwood et al., 2009; Lingwood and Simons, 2010). Estos dominios compartimentalizan la membrana regulando la señalización celular, la proteólisis y organización de proteínas de membrana y los procesos de exocitosis y endocitosis independiente de clatrina (Simons and Ikonen, 1997; Futerman and Hannun, 2004; Holthuis et al., 2003; Nichols, 2003). Su insolubilidad a baja temperatura en detergentes no iónicos como el tritón X-100 permite el aislamiento bioquímico de los rafts en gradientes de densidad y por ello también se denominan membranas resistentes a detergentes o DRMs. Las caveolas son un subtipo de rafts con una morfología específica ya que la presencia de la caveolina provoca la invaginación de la membrana plasmática. Tanto los rafts como las caveolas son entidades dinámicas, que pueden formarse o disiparse y cambiar de tamaño y composición en respuesta a diferentes estímulos externos (Chakraborty and Jiang, 2013).

Los cambios en los niveles de SM, y por tanto la modulación de los rafts lipídicos, contribuyen a la regulación de la **señalización celular**. En neuronas el aumento de SM con la edad permite la salida de rafts del receptor de neurotrofinas TrkB (receptor de tirosina quinasa B), promoviendo su activación y proporcionando un mecanismo que aumenta la supervivencia celular (Trovo et al., 2011). La SM puede participar también en señalización de manera indirecta a través de sus metabolitos como la ceramida o la esfingosina-1-P que contribuyen a la regulación de procesos como la autofagia, la respuesta inmune o el crecimiento celular teniendo en muchos casos efectos antagónicos (Schwarz and Futerman, 1997; Mitoma et al., 1998; Tommasino et al., 2015; Maceyka and Spiegel, 2014).

### 1.1.3. La síntesis de la SM

La síntesis de la SM depende de una serie de enzimas localizadas en las membranas de la vía secretora. Comienza en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático (RE) con la condensación de la serina con un conjugado de ácido graso y coenzima A (AG-CoA) (Dickson et al., 2006; Hannun and Obeid, 2008). Esta reacción es el paso limitante de la tasa de síntesis *de novo* de esfingolípidos y es catalizada por la enzima palmitoiltransferasa. Un paso de reducción posterior produce los intermediarios clave: las esfingosinas. Cuando estas son aciladas con un segundo AG-CoA se producen las ceramidas mediante la acción de las ceramida sintasas.

Una vez sintetizadas en el RE, las ceramidas se transportan al aparato de Golgi para su posterior modificación. Este transporte ocurre mediante tráfico vesicular o por la proteína transportadora citosólica CERT (D'Ángelo et al., 2007; Funato and

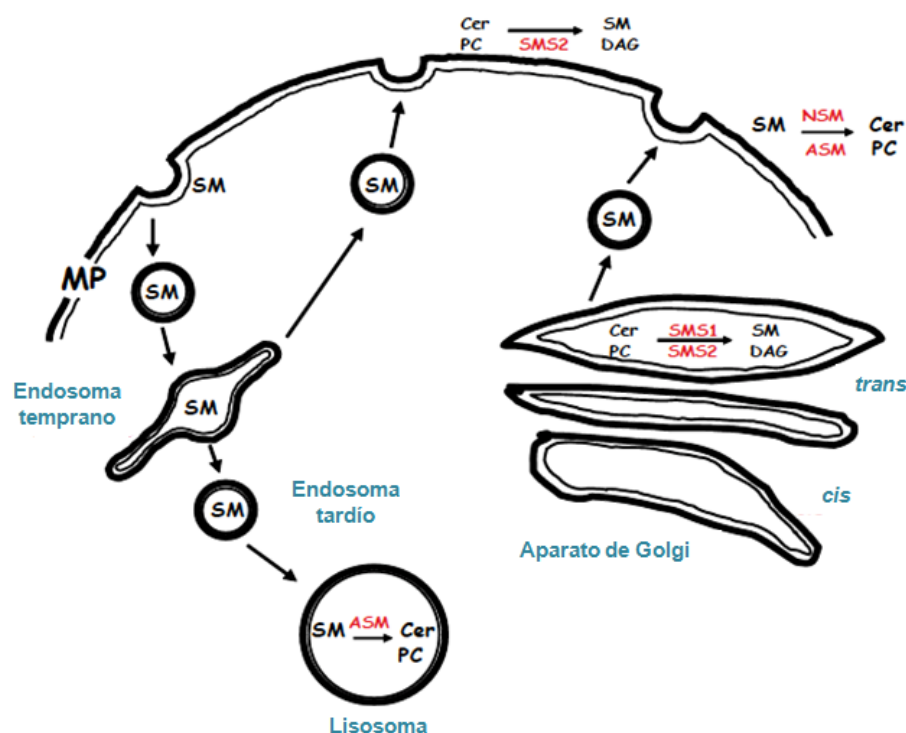
Riezman, 2001; Hanada et al., 2003). En el aparato de Golgi las ceramidas sufren modificaciones específicas en el grupo de cabeza que las convierten en glucoesfingolípidos o en SM. La adición del grupo fosfocolina en el caso de la SM la lleva a cabo la esfingomielina sintasa (SMS) a partir de fosfatidilcolina, produciendo a la vez diacilglicerol (DAG). Las SMS son proteínas formadas por seis hélices transmembrana con el dominio catalítico orientado hacia la cara luminal del Golgi o el espacio extracelular. Entre ellas se encuentran la SMS1 y la SMS2, ambas presentes en la red trans-Golgi. Desde el Golgi la SM se transporta hacia la membrana plasmática, donde es especialmente abundante, por la vía secretora (Lingwood and Simons, 2010). La SMS2 se encuentra también en la membrana plasmática, por lo que puede modular los niveles de SM de manera directa en este sitio celular (Tafesse et al., 2006). En la figura 1.2 se muestra un esquema del proceso de síntesis de la SM.

#### 1.1.4. El catabolismo de la SM

La abundancia de la SM y su relevante contribución a la homeostasis de la membrana, además de la implicación de sus catabolitos en importantes funciones celulares, hacen que la degradación de este esfingolípido esté muy regulada. La familia de las esfingomielinasas (SMasas) hidrolizan la SM produciendo ceramida y fosfocolina libre. Las SMasas de mamíferos se dividen en tres categorías según el pH óptimo para su actividad: esfingomielinasa alcalina, esfingomielinasas neutrales (NSM) y esfingomielinasa ácida (ASM). Aunque los tres tipos catalizan la misma reacción no están relacionados evolutivamente y tienen una distribución subcelular diferente (Tani and Hannun, 2007; Marchesini and Hannun, 2004). La SMasa alcalina se expresa exclusivamente en intestino e hígado y juega un papel en la digestión de la SM de la dieta (Duan et al., 2003). Las SMasas ácida y neutral presentan expresión ubicua y sirven como principales reguladores del catabolismo de SM en la mayoría de tejidos.

En mamíferos se han identificado tres genes diferentes, *SMPD2*, *SMPD3* y *SMPD4* (de SM fosfodiesterasa), que codifican para NSM1, NSM2 y NSM3, respectivamente. Estas tres enzimas, que dependen de  $Mg^{2+}$ , están implicadas en diferentes vías de señalización (Clarke et al., 2006). La NSM1 se localiza en el RE y en el núcleo (Tomiuk et al., 2000; Mizutani et al., 2001). Sin embargo, su actividad SMasa se ha detectado *in vitro* pero no *in vivo* (Sawai et al., 1999). Por el contrario, la NSM3 posee actividad SMasa *in vitro* e *in vivo* y se localiza en el aparato de Golgi y en el RE (Krut et al., 2006). La NSM2 es la más estudiada y su localización en el compartimento de Golgi o en la membrana plasmática (Hofmann et al., 2000; Tani and Hannun, 2007) es un proceso dinámico muy regulado (Clarke et al., 2008).

La ASM fue la primera SMasa que se caracterizó en células de mamíferos. Está codificada por el gen *SMPD1* localizado en el cromosoma 11. La molécula de mRNA puede dar lugar a tres variantes de *splicing* aunque sólo el transcrito 1 producirá enzima funcional (Schuchman et al., 1991; Schuchman et al., 1992). Inicialmente la



**Figura 1.2. Síntesis y degradación de SM.** Esquema de la síntesis y degradación de SM. Se marcan en rojo las enzimas principales que intervienen en ambas vías. La síntesis de SM tiene lugar en la cara trans del aparato de Golgi, a partir de ceramida (Cer) y fosforilcolina (PC), mediante la acción de la esfingomielina sintasa 1 (SMS1) o de la esfingomielina sintasa 2 (SMS2). Posteriormente las nuevas moléculas de SM son transportadas hasta las membranas en las que serán integradas. Además, la SMS2 puede catalizar directamente la reacción en la membrana plasmática (MP). En la reacción, además de SM, se genera diacilglicerol (DAG). La degradación de SM comienza en la membrana plasmática. Las moléculas de SM son endocitadas y transportadas, a endosomas tempranos donde son redirigidas a la membrana o transportadas a endosomas tardíos que a su vez se fusionan con lisosomas. En el lisosoma la SM es degradada por la acción de la esfingomielinasa ácida (ASM) generándose Cer y DAG. La SM presente en la membrana plasmática puede también ser degradada *in situ* por la acción de la esfingomielinasa neutral (NSM) o por pequeñas cantidades de ASM que se encuentran en este compartimento.

ASM fue descrita como una enzima lisosomal que metaboliza la SM presente en compartimentos endosomales puesto que su pH óptimo *in vitro* e *in vivo* es de 4.5-5 (Fowler, 1969). Sin embargo, posteriormente se identificó una forma secretada de la enzima, codificada por el mismo gen, que participa en procesos como la aterosclerosis, señalización celular en superficie e inflamación (Smith and Schuchman, 2008; Jenkins et al., 2009; Tabas, 1999). Por otra parte, también se ha descrito la presencia de la ASM en membrana plasmática (Liu and Anderson, 1995), donde puede transportarse tras un estímulo determinado como la radiación ultravioleta (Rotolo et al., 2005) o el ligando de Fas/CD95 (Grassmé et al., 2001; Charruyer et al., 2005). La enzima llega a la superficie tras la fusión de los lisosomas secretores (que sirven como compartimento de degradación y de secreción) con la membrana plasmática

de manera que la ASM queda expuesta en la cara extracelular. La existencia de microambientes ácidos en la membrana plasmática explica que la enzima pueda actuar a este nivel (Bourguignon et al., 2004; Steinert et al., 2008). Gracias a ello la ASM no sólo hidroliza SM en ceramida en el lisosoma sino que además participa en importantes procesos de señalización celular desde la membrana plasmática. En la figura 1.2 se muestra un esquema del proceso completo de síntesis y degradación de SM.

La deficiencia de esta enzima debida a mutaciones en el gen que la codifica, *SMPD1*, causa las enfermedades de Niemann Pick tipo A (NPA) y B (NPB). En la NPA las mutaciones provocan una pérdida casi total de la actividad de la ASM y los pacientes sufren neurodegeneración rápida y progresiva que lleva a la muerte a los 2-3 años de edad (Schuchman y Desnick, 2001). Por su relevancia en esta tesis se describirá con más detalle a continuación. Los pacientes de NPB conservan una actividad residual de la ASM suficiente para evitar los síntomas neurológicos y alargar la esperanza de vida aunque la enfermedad cursa con anomalías viscerales como hepatosplenomegalia, insuficiencia pulmonar y enfermedad cardiovascular (Graber et al., 1994).

## 1.2. La enfermedad de Niemann Pick tipo A

El primer paciente de NPA fue descrito en 1914 por el pediatra alemán Albert Niemann. Hasta el año 1930 no se identificó la SM como el lípido que se acumulaba de forma primaria en las células de estos pacientes y hubo que esperar hasta los años 60 para que la enfermedad se asociara con la deficiencia en la ASM (Crocker, 1961; Brady et al., 1966). Fue entonces cuando la NPA se clasificó como una enfermedad de depósito lisosomal (LSD), puesto que ésta es la localización preferente de la enzima.

### 1.2.1. Causas de la NPA

Se trata de una enfermedad genética rara con una incidencia de entre 0.5 y 1 afectados por cada 100000 nacimientos. Presenta herencia autosómica recesiva y, como se comentó anteriormente, está causada por mutaciones en el gen *SMPD1* que codifica para la ASM y se localiza en el cromosoma 11 (da Veiga Pereira et al., 1991). La región donde se encuentra el gen presenta impronta genómica o *imprinting* de manera que se expresa preferentemente a partir del alelo materno debido a diferencias en la metilación (Simonaro et al., 2006).

Se conocen alrededor de 120 mutaciones en este gen que incluyen mutaciones puntuales, pequeñas delecciones y alteraciones en el *splicing* (Dardis et al., 2005; Pittis et al., 2004; Ricci et al., 2004; Rodríguez-Pascau et al., 2009; Sikora et al., 2003; Simonaro et al., 2002). En el caso de la comunidad judía Ashkenazi, donde la NPA es particularmente frecuente, se han descrito tres mutaciones responsables de más del 90 % de los casos. Dos de ellas son mutaciones de cambio de sentido en las que se cambia la arginina 496 por una lisina (R496L) o la lisina 302 por una prolina



(L302P). La tercera mutación es una delección que produce la pérdida de la pauta de lectura y la introducción de un codón de parada en la secuencia de la proteína (fsP330). Estas mutaciones producen la pérdida de función de la ASM provocando que su actividad sea menor del 2 % de la normal (Graber et al., 1994). Esta drástica deficiencia determina que la SM no sólo se acumule en los lisosomas sino también en la membrana plasmática de las células de los pacientes de NPA incluidas las neuronas (Galvan et al., 2008). Esto tiene consecuencias patológicas importantes a cuya caracterización ha contribuido en gran manera la existencia de un modelo animal para la enfermedad.

### 1.2.2. Modelo de ratón para NPA

La dificultad para disponer de muestras de pacientes de NPA dada su baja incidencia, la falta de tratamiento y el hecho de ser una enfermedad monogénica impulsaron la creación de un ratón modelo en los años 90 para estudiar la patología y buscar estrategias para revertirla. Este ratón fue generado por dos laboratorios independientes de manera simultánea (Horinouchi et al., 1995; Otterbach and Stoffel, 1995). Para ello se eliminó el gen de la ASM (ASM-/-) lo que le lleva a mimetizar los principales síntomas neurológicos y viscerales de NPA y a la muerte temprana a los 7-8 meses de edad. La SM se acumula progresivamente en las células de los ratones ASM-/- provocando el aumento de tamaño de órganos como el hígado y el bazo además de tener un fuerte impacto en el cerebro. En este órgano las consecuencias patológicas se han descrito en distintos tipos celulares.

La SM se acumula en la membrana plasmática de los oligodendrocitos que forma la mielina, la capa que envuelve los axones facilitando la transmisión del impulso nervioso. Los ratones ASM-/- presentan una disminución de proteínas y factores de transcripción de la mielina como MBP o SOX10 (Buccinna et al., 2009) que podrían explicar la desmielinización que sufren y que también se ha descrito en pacientes de NPA.

Una de las primeras observaciones que se hizo en los ratones ASM-/- es la degeneración temprana y progresiva de las células de Purkinje del cerebelo con la consecuente disfunción en la coordinación motora (Horinouchi et al., 1995; Otterbach and Stoffel, 1995; Macauley et al., 2008). Entre estas neuronas, las que son negativas para el marcador zebrina II se ven particularmente comprometidas (Sarna et al., 2001). Aunque todavía no se ha esclarecido la causa de esta diferente susceptibilidad entre células morfológicamente idénticas pero con diferentes fenotipos moleculares se han postulado varias hipótesis. Entre ellas se propone la distribución diferente de las proteínas Hsp25 (*Heat shock protein 25*) (Armstrong et al., 2001) y el receptor del factor de crecimiento neuronal p75 (Dusart et al., 1994). Mientras que la alta expresión de Hsp25 protegería a las neuronas positivas para zebrina II, la alteración en la señalización del factor de supervivencia p75 en las neuronas negativas para esta proteína desencadenaría su muerte temprana (Sarna et al., 2001).

La SM se acumula de manera primaria en las neuronas de ratones ASM-/- no

sólo en los lisosomas sino también en la membrana plasmática y sináptica (Galvan et al., 2008) (Camoletto et al., 2009). Se han descrito alteraciones secundarias en los niveles de otros lípidos como el aumento de esfingosina (Camoletto et al., 2009) y el de los gangliósidos GM2 y GM3 (Scandroglio et al., 2008), también evidente en muestras de cerebro de pacientes (Rodríguez-Lafrasse and Vanier, 1999), mientras que los niveles de colesterol o ceramida no cambian significativamente (Camoletto et al., 2009).

Estudios recientes han permitido determinar diferentes mecanismos patológicos asociados a la acumulación de SM o sus derivados en neuronas de ratones ASM-/- . El aumento de SM en la membrana plasmática interfiere con la endocitosis de moléculas presentes en rafts lipídicos, como la proteína priónica o el gangliósido GM1, que pierden su distribución polarizada al axón y aparecen en dendritas (Galvan et al., 2008). El aumento de SM y sus derivados en la sinapsis tiene consecuencias en la plasticidad pre y postsináptica. Así, el aumento de la esfingosina altera la interacción de moléculas que median el acoplamiento de vesículas sinápticas a la membrana (Syntaxina 1 y Munc 18) afectando la plasticidad presináptica (Camoletto et al., 2009). Los altos niveles de SM de la membrana postsináptica impiden la unión y activación de la GTPasa RhoA, lo que dificulta la polimerización de actina reduciendo el tamaño de las espinas dendríticas (Arroyo et al., 2014). A su vez, la acumulación lisosomal de SM provoca la permeabilización parcial de estos orgánulos, lo que dificulta el proceso de autofagia y la eliminación de material de desecho celular (Gabandé-Rodríguez et al., 2014).

### **1.2.3. Estrategias terapéuticas para NPA**

A pesar de que gracias al modelo de ratón para NPA vamos conociendo los mecanismos moleculares patológicos aún no existe un tratamiento para esta enfermedad. Únicamente se administran fármacos paliativos que mejoran la calidad de vida de los pacientes. Se han probado diferentes estrategias en los ratones ASM-/- como el reemplazamiento del gen de ASM por inyecciones intracraneales de vectores virales conteniendo el gen correcto (Dodge et al., 2005; Passini et al., 2005) y el trasplante intracerebral de células derivadas de la médula ósea (Jin et al., 2002) o de progenitores neuronales de ratones adultos (Shihabuddin et al., 2004). Aunque estas estrategias consiguieron reducir los niveles de SM y retrasar la muerte de las células de Purkinje, sus efectos fueron locales y transitorios además de requerir procedimientos invasivos.

Para evitar esto último se han ensayado estrategias como la infusión de la enzima ASM recombinante por vía intravenosa o farmacológicas. Aunque la infusión de la ASM recombinante consiguió mejorar significativamente la patología visceral, la incapacidad de la enzima suministrada periféricamente para atravesar la barrera hematoencefálica impidió mejoras a nivel neurológico (Miranda et al., 2000a). Por ello, aunque este método no se considera una opción terapéutica para los pacientes de NPA, sí se está llevando a cabo actualmente un ensayo clínico con la ASM

recombinante en pacientes de NPB. Por otro lado, la administración oral de la dexametasona, que cruza la barrera hematoencefálica, consiguió disminuir los niveles de SM en sinapsis mediante la activación de la NSM2 aumentando el tamaño de las espinas dendríticas y previniendo déficits cognitivos y motores en los ratones ASM-/- (Arroyo et al., 2014). Aún está por determinar la aplicabilidad de esta estrategia a pacientes de NPA o de otras LSDs que también se caracterizan por altos niveles de SM en cerebro.

### 1.3. Enfermedades de depósito lisosomal (LSDs)

Como se ha mencionado las LSDs, entre las que se encuentra la NPA, comparten mecanismos patológicos y síntomas a pesar de tener causas diferentes. Las LSDs son un grupo de unas 50 enfermedades genéticas que se caracterizan por la acumulación de macromoléculas en el sistema endocítico tardío. Son trastornos monogénicos, normalmente de herencia autosómica recesiva, que considerados en conjunto afectan a 1 de cada 5000 nacidos. Están causadas por defectos en enzimas lisosomales solubles, en proteínas lisosomales no enzimáticas o en proteínas no lisosomales que comprometan la función de este orgánulo.

Las LSDs se desarrollan cuando la actividad de la enzima lisosomal afectada disminuye por debajo de un umbral determinado y la tasa de degradación de su sustrato es menor que la de síntesis (Conzelmann and Sandhoff, 1983). El nivel de función residual de la proteína afectada determina la edad en la que empiezan a manifestarse los síntomas. Así, los pacientes en los que hay una pérdida casi total de la proteína suelen presentar los primeros síntomas *in utero* o en la infancia, mientras que mutaciones con efectos más suaves dan lugar a la aparición de la enfermedad en la etapa juvenil o adulta (Futerman and van Meer, 2004).

#### 1.3.1. El lisosoma

Los lisosomas son vesículas situadas en el citoplasma celular formadas por una capa de membrana simple. La membrana lisosomal presenta bombas protónicas activas de tipo V cuya energía proviene del uso de ATP. De esta manera, en el lisosoma se acumulan H<sup>+</sup>, presentando un pH ácido comprendido entre 4.5 y 5.

Los lisosomas cumplen la función de degradar los componentes de desecho celulares. Para ello poseen alrededor de 40 hidrolasas distintas que pueden degradar todo tipo de macromoléculas. El pH óptimo de las enzimas lisosómicas se adapta al pH ácido y suele estar alrededor de 5. Así, a un pH neutro como el del citoplasma las enzimas lisosomales son poco activas lo que supone un mecanismo protector contra la autodigestión de componentes celulares.

Los lisosomas pueden degradar materiales de origen externo (heterofagia) o interno (autofagia), como macromoléculas, agregados proteicos y orgánulos defectuosos. Además, el proceso de autofagia puede modular de forma directa el catabolismo

de algunos lípidos (Singh et al., 2009). Estos componentes y orgánulos pueden llegar al lisosoma por diferentes vías. Una de ellas está mediada por un complejo de chaperonas que reconocen la proteína que debe ser degradada y que se conoce como autofagia mediada por chaperonas (Koga and Cuervo, 2011). Los agregados proteicos y orgánulos dañados llegan al lisosoma a través de autofagosomas, vesículas de doble membrana que se fusionan con los lisosomas en el proceso conocido como macroautofagia (Mizushima et al., 2008). Por último, en la microautofagia las proteínas celulares y los orgánulos dañados son transportados directamente al lumen del lisosoma mediante invaginaciones de la membrana o por elongaciones de la membrana lisosomal (Li et al., 2012).

Una vez en el lisosoma, estas macromoléculas y orgánulos son degradadas gracias a las numerosas enzimas hidrolíticas, entre las que destacan fosfatasas, glicosidasas, lipasas, sulfatasas, nucleadas y proteasas (Esen et al., 2012). La acumulación de sustratos en el lisosoma como consecuencia de un defecto en alguna de estas enzimas genera las LSDs.

### **1.3.2. Clasificación de las LSDs**

Las enfermedades de depósito lisosomal se clasifican según la naturaleza bioquímica del sustrato que se acumula. Así existen esfingolipidosis, oligosacaridosis o mucopolisacaridosis en las que se acumulan, esfingolípidos, oligosacáridos o mucopolisacáridos respectivamente. En la siguiente tabla se recogen los diferentes tipos de LSDs.

Tipo	Biomolécula acumulada	Ejemplos	Proteína implicada
<b>Glucogenosis</b>	Glucógeno	Enfermedad de Pompe	$\alpha$ -glucosidasa ácida
<b>Glucoproteínosis</b>	Galactósidos Glicoproteínas Glicolípidos	Galactosialidosis	Catepsina A
<b>Mucopolisacaridosis</b>	Glucosaminoglicanos	Mucopolisacaridosis tipo II o síndrome de Hunter  Mucopolisacaridosis tipo III o síndrome de Sanfilippo tipo A, B, C, D	Iduronato-2-sulfatasa  Heparan sulfaminasa (A) N-acetilglucosaminidasa (B) Heparan-N-glucosamina N- acetiltransferasa (C) N-acetilglucosamina 6- sulfatasa (D)
<b>Esfingolipidosis</b>	Esfingolípidos	Enfermedad de Gaucher Enfermedad de Niemann Pick tipo A y B Enfermedad de Fabry	$\beta$ -Glucosidasa o saposina C Esfingomielinasa ácida  $\alpha$ -galactosidasa
<b>GM1 gangliosidosis</b>	Gangliósido GM1	Gangliosidosis tipo I GM1	$\beta$ -galactosidasa
<b>GM2 gangliosidosis</b>	Gangliósido GM2	Enfermedad de Sandhoff Enfermedad de Tay Sachs	$\beta$ -Hexosaminidasas A y B $\beta$ -Hexosaminidasa A
<b>Mucolipidosis</b>	Mucopolisacáridos	Mucolipidosis tipo IV	Mucopolina 1
<b>Ceroidlipofuscinosis</b>	Lipopigmentos	Enfermedad de Batten	CLN3
<b>Otras lipidosis</b>	Otros lípidos como el colesterol	Enfermedad de Niemann Pick tipo C y D	NPC1 (C), NPC2 (D)

### 1.3.3. Mecanismos patológicos en las LSDs

La incapacidad de las células afectadas de gestionar el material acumulado resulta en la formación de cuerpos de almacenamiento, orgánulos endocíticos defectivos que contienen el material no degradado. A pesar de la distinta naturaleza del material que se acumula en las diferentes LSDs, éstas presentan características bioquímicas, celulares y clínicas en común. La neurodegeneración está presente en la mayoría de estas enfermedades aunque con diferentes niveles de afectación (Nixon et al., 2008). Entre las características bioquímicas y celulares comunes que contribuyen a la muerte neuronal destacan alteraciones en procesos como la autofagia, el estrés oxidativo y estrés de retículo, la homeostasis de calcio, la inflamación y el tráfico intracelular de lípidos. La siguiente tabla resume estas alteraciones para los distintos casos de esfingolipidosis. Como se puede observar en esta tabla, no se ha caracterizado la posible contribución del estrés oxidativo y la homeostasis de calcio intracelular a la patología de NPA. Por su relevancia en esta tesis pasaremos a describir ambos procesos.

Enfermedad	Proteína defectiva	Material acumulado	Estrés oxidativo	Estrés de RE y UPR	Alteraciones en la homeostasis de calcio	Autofagia	Inflamación	Tráfico de lípidos alterado
<b>GM1 gangliosidosis</b>	$\beta$ -galactosidasa	Gangliósido GM1	Wei et al., 2008	Tessitore et al., 2004 Sano et al., 2009	Tessitore et al., 2004 Sano et al., 2009	Takamura et al., 2008	Jeyakumar et al., 2003	Chen et al., 1999
<b>GM2 gangliosidosis</b>	$\beta$ -Hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM2	Jeyakumar et al., 2003		Pelled et al., 2003	Pelled et al., 2003 Pacheco et al., 2007	Jeyakumar et al., 2003	Chen et al., 1999
<b>GM2 gangliosidosis</b>	$\beta$ -Hexosaminidasa A	Gangliósido GM2	Wei et al., 2008	Wei et al., 2008			Jeyakumar et al., 2003	Chen et al., 1999
<b>Gaucher</b>	$\beta$ -Glucosidasa Activador saposina C	Glucosilceramida	Deganuto et al., 2007 Roversi et al., 2006	Lee et al., 2011	Korkotian et al., 1999 Lloyd-Evans et al., 2003 Pelled et al., 2005	Osellame et al., 2013 Xu et al., 2014	Boot et al., 2004 Allen et al., 1997	Sillence et al., 2002
<b>Fabry</b>	$\alpha$ -Galactosidasa A	Globotriaosilceramida	Shen et al., 2008			Chévrier et al., 2010		Chen et al., 1999
<b>Niemann Pick tipo A</b>	Esfingomielinasa ácida	Esfingomielina			Ginzburg et al., 2005	Gabandé et al., 2014	Dhami et al., 2001	Chen et al., 1999

## 1.4. La regulación de calcio intracelular

Los iones de calcio generan señales intracelulares versátiles que determinan una gran variedad de funciones en cada tipo celular del organismo (Berridge et al., 2000), incluyendo el control de la contracción celular del músculo cardíaco (Dulhunty, 2006) así como la regulación de aspectos vitales del ciclo celular desde la proliferación hasta la muerte celular (Lu and Means, 1993; Orrenius et al., 2003). En el sistema nervioso, los iones de calcio conservan e incluso extienden su enorme grado de versatilidad debido a la compleja morfología de las neuronas. En los terminales presinápticos, el influjo de calcio induce la exocitosis de las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores (Neher and Sakaba, 2008). En la postsinapsis, un aumento transitorio en los niveles de calcio en las espinas dendríticas, profusiones altamente especializadas de la membrana que reciben la mayoría de sinapsis excitatorias, es esencial para la inducción de la plasticidad sináptica (Zucker, 1999). En otro compartimento celular, el núcleo, las señales de calcio pueden modular la transcripción génica (Lyons and West, 2011). Así, las señales intracelulares de calcio regulan procesos que operan en un amplio rango de tiempo: desde la liberación de neurotransmisores en una escala de microsegundos hasta la transcripción génica que dura hasta minutos e incluso horas (Berridge et al., 2003). Esta versatilidad requiere una fina regulación temporal y espacial.

### 1.4.1. Mecanismos de regulación de calcio

En las neuronas de mamíferos el calcio es un segundo mensajero intracelular esencial. En condiciones de reposo las neuronas tienen una concentración de calcio intracelular de 50-100 nM que puede aumentar de forma transitoria durante la actividad eléctrica hasta 100 veces (Berridge et al., 2000). La concentración citosólica

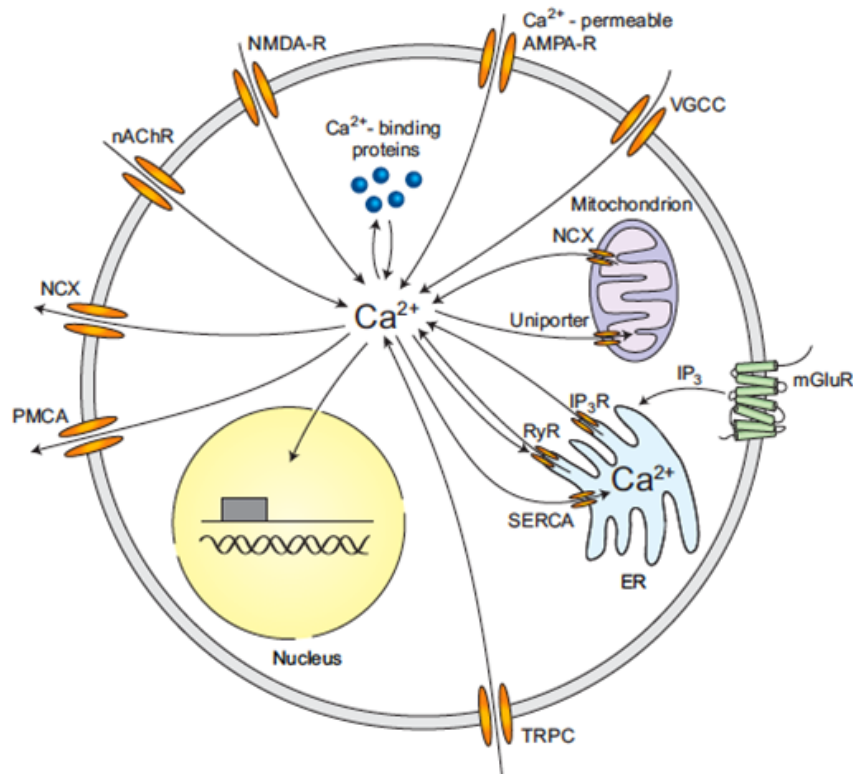
de calcio está determinada por el equilibrio entre su influjo y extrusión. Además, proteínas que unen calcio como la parvalbúmina, la calbindina-D28k o la calretinina actúan como tampones de este ión y determinan la dinámica del calcio libre en las neuronas (Schwaller, 2010) que es el biológicamente activo.

Existen múltiples mecanismos que regulan el influjo de calcio desde el espacio extracelular, incluyendo los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), receptores de glutamato ionotrópicos AMPA y NMDA, receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y los canales TRPC ( *Transient Receptor Potential type C*) (Fucile, 2004; Higley and Sabatini, 2008; Ramsey et al., 2006). Los iones de calcio son eliminados del citosol en las neuronas mediante proteínas localizadas en orgánulos intracelulares o en la membrana plasmática. La liberación de calcio desde los almacenes intracelulares, principalmente el RE, está mediada por los receptores de inositol trifosfato (IP3R) y los receptores de ryanodine (Berridge, 1998). El inositol trifosfato puede generarse en las neuronas por la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (Niswender and Conn, 2010). Los altos niveles de calcio en el RE se mantienen mediante la ATPasa SERCA ( *Sarco-/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) que transporta estos iones desde el citosol al lumen del RE. Además del RE, la mitocondria es importante para la homeostasis de calcio intraneuronal. Este orgánulo puede actuar como mecanismo tamponador captando calcio citosólico a través de un uniportador y liberarlo de nuevo lentamente mediante intercambio con sodio (Duchen, 1999).

Los dos sistemas de extrusión de calcio en la membrana plasmática son la calcio ATPasa de membrana PMCA ( *Plasma Membrane Calcium ATPase* ) y el intercambiador de sodio-calcio NCX ( *Sodium-Calcium exchanger*) (Berridge et al., 2003), que tienen características diferentes. Mientras que NCX tiene baja afinidad por calcio pero elevada capacidad para exportarlo, PMCA presenta baja capacidad de transporte pero alta afinidad por este ión y se considera la responsable de la regulación fina del calcio citosólico. En la Figura 1.3 se muestra un esquema representativo de la regulación de calcio en neuronas.

**PMCA** La proteína PMCA es una bomba de calcio que se expresa de forma ubicua en la membrana plasmática de las células eucariotas. En células no excitables, como las células acinares pancreáticas, donde NCX no se expresa o lo hace en niveles muy bajos, esta proteína es la principal vía de extrusión de calcio. Pero incluso en células en las que NCX se expresa de manera abundante PMCA es crítica para mantener la concentración intracelular de calcio debido a su gran afinidad por este ión (Carafoli, 1994).

Se trata de una ATPasa de tipo P que presenta 10 dominios transmembrana con los dominios N y C-terminal localizados en el citoplasma. Está codificada por cuatro genes diferentes *PMCA1-4*, localizados en los cromosomas 12, 3, X y 1, respectivamente (Olson et al., 1991; Brandt et al., 1992; Latif et al., 1993; Wang et al., 1994). Estos genes dan lugar a numerosas variantes de *splicing* que presentan diferente distribución tisular, localización celular y diversidad funcional (Monteith



**Figura 1.3. Regulación de calcio en neuronas.** Las fuentes de entrada de calcio en las neuronas son los receptores de glutamato permeables a calcio AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato), los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) y los canales TRPC. La liberación de calcio desde los almacenes intracelulares está mediada por los receptores de inositol trifosfato ( $IP_3R$ ) y rianodina (RyR). El inositol trifosfato puede producirse a partir de la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). La salida de calcio está regulada por la ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), el intercambiador de sodio-calcio (NCX) y SERCA. Además, la mitocondria es importante para la homeostasis de calcio. Adaptado de Grienberger y Konnerth, 2012.

et al., 1998; Strehler and Zacharias, 2001). Los productos de estos diferentes genes se conocen normalmente como isoformas. PMCA1 y PMCA4 se expresan de forma ubicua en los tejidos animales por lo que se pensó que eran las isoformas implicadas en la regulación basal de calcio. Las isoformas PMCA2 y PMCA3 presentan una distribución más restringida, con una expresión más elevada en células excitables, sugiriendo una especificidad funcional (Brini et al., 2013).

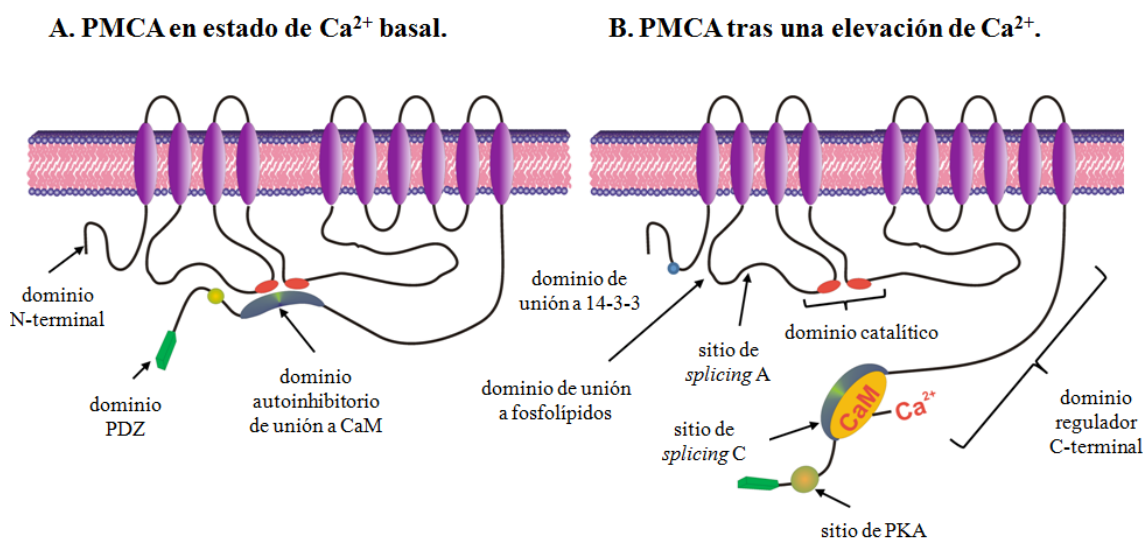
En el sistema nervioso las distintas isoformas presentan un patrón de distribución diferente. El transcrito de PMCA1 se expresa predominantemente en las neuronas piramidales de CA1 (Stahl et al., 1992) pero los niveles de proteína son abundantes en cerebelo y bulbo raquídeo (Stauffer et al., 1995). El mRNA para PMCA2 se encuentra en córtex, cerebelo y bulbo raquídeo (Stahl et al., 1992; Stauffer et al., 1995) y esta proteína es la única isoforma presente en las espinas dendríticas de



## INTRODUCCIÓN

las células de Purkinje (Stauffer et al., 1997) además de ser, junto con PMCA4, las isoformas predominantes en hipocampo (Burette et al., 2003; Zacharias et al., 1997). En cuanto a PMCA3, estudios de hibridación *in situ* han determinado que se localiza en el plexo toroide (Stahl et al., 1992) y a nivel de proteína en cerebelo, córtex e hipocampo (Eakin et al., 1995; Stauffer et al., 1997; Burette et al., 2003). Por último, el mRNA de PMCA4 se ha encontrado en córtex cerebral (Stahl et al., 1994) y en cerebelo (Stauffer et al., 1995; Guerini et al., 1999). Con el uso de anticuerpos específicos se ha confirmado la amplia expresión de esta isoforma en cerebro (Burette et al., 2003).

PMCA es una proteína muy regulada que para conseguir su alta afinidad por calcio necesita de mecanismos activadores. El activador tradicional de PMCA es la **calmodulina** (CaM) (Gopinath and Vincenzi, 1977; Jarrett and Penniston, 1977) que interacciona con el dominio CaM-BD (*Calmodulin binding site*) localizado en el extremo citosólico C-terminal de la proteína. En ausencia de calmodulina, este dominio se encuentra unido a la región citosólica autoinhibitoria entre las hélices transmembrana 2 y 3 (TM2 y TM3) y un segundo sitio entre la TM4 y TM5 (Figura 1.4). La unión de calmodulina a esta región provoca un cambio conformacional en PMCA que aumenta su afinidad por calcio (Falchetto et al., 1992).



**Figura 1.4. Esquema representativo de las principales características estructurales de PMCA en una situación de calcio basal (A) y tras un aumento de calcio (B).** La proteína PMCA está formada por un dominio N-terminal, 10 hélices transmembrana, 4 lazos citosólicos y un dominio regulador C-terminal. Cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es elevada el complejo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se une al dominio autoinhibitorio de unión a CaM provocando un cambio conformacional que expone el sitio catalítico de la proteína, y que consiste en el sitio de unión a ATP y el residuo de aspartato que se fosforila durante el ciclo de reacción. Esto aumenta la actividad transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$  de PMCA. Adaptado de [www.pancreapedia.org](http://www.pancreapedia.org).

PMCA presenta además sitios de **fosforilación** en residuos de serina/treonina y de tirosina. La quinasa PKA fosforila únicamente la isoforma PMCA1 por debajo del

dominio de unión a calbindina. Esta fosforilación aumenta la actividad de la proteína y su afinidad por calcio (Zylinska et al., 1998). Otra quinasa, PKC, fosforila PMCA en un residuo de treonina en el dominio de unión a calmodulina que también activa la proteína (Zylinska et al., 1998), mientras que la fosforilación en residuos de tirosina por quinasas como Src tiene un efecto inhibitorio (Dean et al., 1997; Wan et al., 2003).

La actividad de PMCA también depende de la **composición lipídica** de la membrana donde se localiza. Los fosfolípidos ácidos y los ácidos grasos poliinsaturados pueden activar esta ATPasa uniéndose al dominio CaM-BD o al primer lazo citosólico de la proteína (Brodin et al., 1992; Pinto and Adamo, 2002). Otros lípidos activadores son la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) (Niggli et al., 1981). Además, se ha comprobado que un aumento en la proporción de SM/colesterol en las membranas disminuye la actividad de PMCA *in vitro* (Pang et al., 2005). Por otra parte, la proteína aislada de los rafts lipídicos presenta una mayor actividad (Jiang et al., 2012). La **unión de proteínas específicas** modula la presencia de PMCA en estos dominios y su localización en membrana. Así, Ania3/Homer, contribuiría a reclutar a PMCA a dominios cercanos al influjo de calcio en neuronas regulando la señalización de calcio local y la función sináptica (Sgambato-Faure et al., 2006).

### 1.4.2. Alteraciones en la regulación de calcio en LSDs

Como se ha comentado anteriormente, una de las características patológicas común a muchas de las LSDs es la alteración de los niveles intracelulares de calcio. Sin embargo, los mecanismos que afectan a la homeostasis de calcio son diferentes en cada LSD, dependiendo, entre otros factores, de la interacción del sustrato acumulado con los canales o bombas de calcio.

En varias LSDs se produce un aumento de la liberación de calcio del RE. En la enfermedad de Gaucher la acumulación de glucosilceramida produce directamente una estimulación aberrante del receptor de rianodina del RE (Korkotian et al., 1999; Lloyd-Evans et al., 2003). En la enfermedad de Sandhoff el gangliósido GM2 inhibe la actividad de la ATPasa SERCA, reduciendo la tasa de incorporación de calcio al RE y conduciendo a un aumento de calcio intracelular (Pelled et al., 2003).

Otro de los orgánulos tamponadores de calcio afectados en diversas LSDs es la mitocondria. En un modelo neuronal de gangliosidosis GM1 la acumulación de este lípido en las membranas de RE asociadas a mitocondrias resulta en su permeabilización, que desencadena vías apoptóticas (Sano et al., 2009). En fibroblastos de pacientes con mucopolipidosis tipo IV, en la que se acumulan fosfolípidos, mucopolisacáridos y gangliósidos, se produce fragmentación mitocondrial, disminuyendo su capacidad de tamponamiento (Jennings et al., 2006).

Hasta la fecha ninguna LSD se ha relacionado con alteraciones en la extrusión de calcio en la membrana plasmática mediada por PMCA o NCX, aunque se sabe que ambas bombas están influenciadas por el contexto lipídico de la membrana. En

el caso de PMCA por fosfolípidos ácidos, PIP2 y la proporción de SM/colesterol, como se ha comentado anteriormente, y en el de NCX por PIP2 (Hilgemann and Ball, 1996).

Independientemente del mecanismo concreto que altera el calcio intracelular en cada LSD éste tiene una consecuencia común: el aumento del estrés oxidativo.

### 1.5. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) y los mecanismos encargados de eliminarlos o reparar los daños que generan. Estas especies, en concentraciones moderadas, tienen un papel importante como reguladores en procesos de señalización e incluso protegen a las células contra el estrés oxidativo contribuyendo a reestablecer la homeostasis redox. Sin embargo, a altas concentraciones los radicales libres resultan perjudiciales para los organismos, produciendo oxidación de lípidos y proteínas, activación de factores de transcripción y daño en el DNA que puede desencadenar la muerte celular.

#### 1.5.1. Tipos de radicales libres y sus derivados

Como se ha mencionado anteriormente existen dos principales tipos de especies reactivas, las especies reactivas del oxígeno o ROS y las de nitrógeno o RNS. En cada uno de estos dos grupos podemos encontrar especies que son radicales libres o derivados de estos radicales. Los radicales libres se definen como especies químicas caracterizadas por poseer uno o más electrones desapareados que se forman como intermediarios de reacciones químicas, a partir de la ruptura homolítica de una molécula y, en general, son extremadamente inestables y presentan, por tanto, gran poder reactivo y una vida media muy corta.

Entre las ROS la más abundante es el superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o en el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) espontáneamente o mediante enzimas. Entre las RNS la especie mayoritaria es el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) que da lugar a otras RNS como el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

#### 1.5.2. Mecanismos de formación y eliminación de especies reactivas. Mantenimiento del equilibrio redox

La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es la responsable de la generación de RNS. Existen tres formas de NOS: la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS). Las dos primeras son activadas por calcio, mientras que la forma inducible es independiente de las concentraciones de este catión (Busse and Mülsch, 1990; Cho et al., 1992). Aunque en el sistema nervioso se expresan las tres formas de la enzima la nNOS genera la mayor parte de NO en neuronas.

El principal mecanismo de generación de ROS se da en la mitocondria por escape de electrones de la cadena transportadora desde la coenzima Q hasta el oxígeno produciendo superóxido (Turrens, 2003). Existen además sistemas enzimáticos de generación de ROS como la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (NOX). La xantina oxidasa cataliza los dos pasos finales de la degradación de purinas: la conversión de hipoxantina a xantina y de esta última a ácido úrico, produciendo durante el proceso superóxido pero sobre todo  $H_2O_2$  (Kelley et al., 2010). Las NOX son enzimas formadas por varias subunidades y unidas a membrana que catalizan la reducción de oxígeno a superóxido usando NADPH como donador de electrones y el oxígeno como aceptor. En los mamíferos existen siete isoformas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, oxidasa dual (DUOX)1 y DUOX2. La mayoría de estas isoformas tienen una distribución característica en cada tejido y diferentes mecanismos de activación, como el requerimiento de factores citosólicos, de un aumento intracelular de calcio o regulación a nivel transcripcional (Nayernia et al., 2014).

Los antioxidantes son los responsables de eliminar estas especies reactivas. Son compuestos o enzimas capaces de competir con sustratos oxidables y retrasar o impedir su oxidación. Entre estos mecanismos podemos encontrar compuestos químicos de bajo peso molecular, como las vitaminas C y E, carotenoides y ácido úrico, aunque el más importante es el glutatión (GSH). El GSH controla los niveles de ROS por interacción directa con estos o como cofactor de enzimas detoxificantes que forman el otro gran grupo de antioxidantes. Entre ellas encontramos la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la peroxidasa dependiente de glutatión (Lushchak, 2012).

En condiciones normales los niveles de estas especies reactivas están controlados por la correcta función de los mecanismos de producción y eliminación. Sin embargo, cuando este equilibrio se ve alterado por un aumento de compuestos oxidantes o la deficiencia de moléculas o enzimas antioxidantes se produce una situación de estrés oxidativo. En estas condiciones se ponen en marcha mecanismos para restablecer el equilibrio redox. Uno de ellos es la activación del sistema Nrf2/Keap1. Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) es un factor de transcripción que se asocia a Keap1 (*Kelch-like ECH-associated Protein 1*), un sustrato de ubiquitín ligasas que permite la ubiquitinación y degradación del complejo por el proteasoma en condiciones normales. En respuesta a estrés oxidativo los grupos tiol de Keap1 se oxidan, imposibilitando su unión a Nrf2 que queda libre para transportarse al núcleo y activar elementos ARE (*Antioxidant Response Element*) de respuesta a estrés. Entre los genes que son activados por este factor se encuentran los que codifican para enzimas antioxidantes como la SOD o implicadas en la síntesis de moléculas antioxidantes.

Las respuestas a estrés oxidativo de intensidad intermedia está coordinadas por tres sistemas reguladores: NF- $\kappa$ B, AP-1 y MAP quinasas. Estos sistemas también regulan la expresión de enzimas antioxidantes pero además estimulan la expresión de genes de inflamación y de reprogramación de funciones celulares.

Si a pesar de la activación de estos sistemas el estrés oxidativo persiste las células entran en apoptosis para minimizar las consecuencias que se producirían en un escenario de muerte no controlada como la necrosis.

### 1.5.3. El estrés oxidativo en LSDs

Varios estudios han demostrado el aumento de ROS y RNS en diferentes LSDs. En las gangliosidosis GM1 y GM2 la NOS inducible está elevada en microglía activada y macrófagos (Jeyakumar et al., 2003). Los niveles de ROS están aumentados en modelos de enfermedad de Fabry (Shen et al., 2008). Análisis por microarray en fibroblastos de pacientes de Niemann Pick tipo C muestran que el patrón de expresión génica en esta enfermedad es indicativo de estrés oxidativo (Reddy et al., 2006), además de que los elevados niveles de ROS y de peroxidación de lípidos confieren a las células mayor susceptibilidad a muerte celular tras un estímulo oxidativo (Zampieri et al., 2009). En la mucopolisacaridosis IIIB el estrés oxidativo induce oxidación de lípidos, proteínas y DNA (Villani et al., 2009) y en la mucopolisacaridosis tipo I se ha descrito un desequilibrio oxidativo (Reolon et al., 2009). En la lipofuscinosis ceroides neuronal (NCL) los niveles elevados de ROS y de SOD parecen ser consecuencia del estrés de RE (Kim et al., 2006; Heine et al., 2003).

Todas estas observaciones apuntan a que el estrés oxidativo es un elemento patológico clave en LSDs que se produce por distintos mecanismos (Wei et al., 2008). Determinar estos últimos en cada LSD es necesario para plantear estrategias terapéuticas comunes o individuales. En esta tesis se ha estudiado por primera vez este escenario en la NPA.



## 2. OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos estudiar la influencia de los niveles de SM en dos procesos que están alterados en diferentes LSDs y que no se han caracterizado en NPA: la homeostasis de calcio y el estrés oxidativo. Para ello se establecieron los siguientes objetivos:

1. Analizar la presencia de marcadores de estrés oxidativo en un paciente de NPA y en ratones ASM-/- que son modelo para esta enfermedad.
2. Estudiar las posibles alteraciones en los niveles de calcio en neuronas ASM-/-, caracterizar el mecanismo molecular subyacente y determinar su relación con el estrés oxidativo.
3. Ensayar estrategias que permitan revertir estas alteraciones *in vitro* e *in vivo*.





## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados en la inmunodetección de proteínas en SDS-PAGE (WB) y en inmunohistoquímica (IHQ) se describen en la siguiente tabla (Tabla I). En los ensayos de WB se utilizaron como anticuerpos secundarios un anticuerpo de conejo anti-ratón y uno de cabra anti-conejo a una dilución 1/1000 (Dako). En los estudios de inmunofluorescencia se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo, anti-ratón o anti-pollo Alexa 488 o 555 (Invitrogen).

### 3.2. Muestras de pacientes

Las muestras del individuo control (2 años de edad) y del paciente NPA (3 años) fueron obtenidas del Banco de Tejidos Fundación Cien (BT-CIEN, Madrid, España) y de la fundación Wylder Nation Foundation (Scottsdale, EE.UU.), respectivamente. La muestra control presentaba un patrón de maduración normal sin anomalías en el cerebro en un examen histológico de rutina. Los tejidos fueron fijados con paraformaldehído 4 % y embebidos posteriormente en parafina (Sigma) para su procesamiento.

Anticuerpo	Proteína	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF/IHC
PMCA	Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de membrana plasmática	ratón	Thermo Scientific (5F10)	1:1000	
Flotilina-1	Flotilina-1	ratón	BD Transduction laboratories (clon 18)	1:1000	
H3	Histona H3	conejo	Cell Signaling Technology	1:1000	
AcH3K18	Acetil-histona H3 (Lys18)	conejo	Cell Signaling Technology	1:1000	
$\alpha$ -tubulina	$\alpha$ -tubulina	ratón	Sigma-Aldrich	1:10000	
$\beta$ -actina	$\beta$ -actina	ratón	Sigma-Aldrich	1:10000	
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	ratón	Abcam	1:20000	
Vinculina	Vinculina	conejo	Millipore	1:1000	
ATP6V1A	H <sup>+</sup> -ATPase V1 (subunidad A)	conejo	Proteintech	1:1000	
Calbindina	Calbindina	conejo	Swant		1:500
NeuN	Núcleo neuronal	ratón	Millipore (A60)		1:500

### 3.3. Ratones

#### 3.3.1. Características y mantenimiento

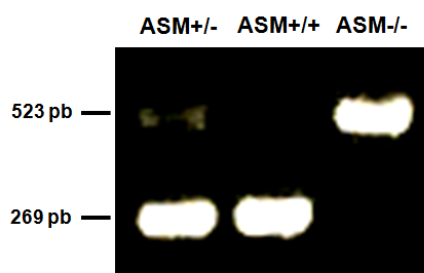
Los estudios se llevaron a cabo en ratones C57BL/6 en los que se ha suprimido la expresión del gen *SMPD1*, que codifica para la ASM, por inserción de una construcción de neomicina en el exón 2 del gen, tal como se describe en Horinouchi et al., 1995. Estos ratones desarrollan un fenotipo muy similar al de la enfermedad de NPA (Horinouchi et al., 1995). Como controles se usaron ratones hermanos derivados de cruces de heterocigotos que no habían heredado la mutación. La esperanza de vida de los ratones ASM<sup>-/-</sup> es de 7-8 meses. Para los estudios de esta tesis se usaron ratones macho de 4 meses, en los que se pueden observar los cambios que ocurren en las etapas iniciales de la enfermedad.

Los animales fueron mantenidos en el animalario del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”. Los cuidadores agruparon a los ratones en un número de cinco por jaula, con comida y agua disponible *ad libitum* y los mantuvieron en un ambiente de temperatura controlada siguiendo un ciclo de luz-oscuridad de 12 y 12

horas respectivamente con el inicio de la luz a las 8 a.m. El uso de animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la comisión de Bioética del CSIC y de la Comunidad Autónoma de Madrid.

### 3.3.2. Genotipado mediante PCR

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo ADN genómico de una pequeña porción de cola de los animales que fue digerida con 10 mg/ml de proteinasa K (Merck) en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 100 mM, 1 % SDS) a 60 °C durante dos horas. El ADN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol frío mediante centrifugación para ser posteriormente resuspendido en agua miliQ estéril. Para el genotipado se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987). Ésta se realizó en un medio que contenía el tampón de la Taq ADN polimerasa (5X), dNTPs 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 μM, oligo sentido 0,5 μM, oligos antisentido 0,5 μM, 2 μl de DNA y 1,25 U de Taq ADN polimerasa (Promega), en un volumen final de 12 μl. Para la amplificación con un termociclador se usó un programa consistente en 30 ciclos de 93 °C 1 min, 58 °C 1 min y 72 °C 1 min con un oligonucleótido sentido que reconoce el gen de codificante de la ASM (AGCCGTGTCCTCTTCCTTAC) y dos oligonucleótidos antisentido; uno de ellos que reconoce el inserto de resistencia a neomicina (GGCTACCCGTGATATTGCTG) y otro que reconoce el exón 2 del gen de la ASM (CGAGACTGTTGCCAGACATC). Como resultado, en ratones control (+/+) se detectó una única banda de 269 pb correspondiente al gen endógeno, en ratones homocigotos para el noqueo del gen (-/-) se detectó una única banda de 523 pb y en ratones heterocigotos para el noqueo del gen (+/-) se detectaron ambas bandas (Figura 3.1) (Horinouchi et al., 1995).



**Figura 3.1. Genotipado de ratones por PCR.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el caso de los ratones ASM+/+ se detecta un único producto de PCR de 269 pb. En el caso de los ratones ASM -/- el producto de PCR es de 523 pb, mientras que en ratones ASM +/- se pueden detectar ambos productos.

---

### 3.3.3. Sacrificio de ratones, disección y tratamiento del tejido

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical o usando una cámara de CO<sub>2</sub>. A continuación, se diseccionaron para obtener el encéfalo y se obtuvo el hipocampo y el cerebelo de cada hemisferio. Estos tejidos se trataron de diferentes formas:

#### a) Preparación de homogenizados para análisis bioquímicos.

El hipocampo y el cerebelo de uno de los hemisferios se homogenizaron en un tampón MES (ácido 2-(N-Morpholino)ethanesulfónico) 25 mM pH 7, NaCl 150 mM, EDTA (ácido etildiaminotetraacético) 2 mM, NaF 1 mM, inhibidores de fosfatas (Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas (COMPLETET de Roche).

Para la medida de actividad de PMCA se usó un tampón HEPES-KOH 10 mM pH 7.4, sacarosa 0.32 M, MgSO<sub>4</sub> 0.5 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM, inhibidores de fosfatas (Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas (COMPLETE<sup>TM</sup> de Roche).

#### b) Preparación de rodajas de hipocampo.

El hipocampo del otro hemisferio se diseccionó en medio especial de disección (glucosa 10 mM, KCl 4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, sacarosa 234 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM) y se cortó en rodajas de 400  $\mu$ m de forma automática usando el McIlwain Tissue Chopper (Mickle). Posteriormente se equilibraron en medio ACSF (*Artificial Cerebrospinal Fluid*): NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 11 mM, que se filtró para evitar contaminaciones. Antes de usarse se oxigenó con carbógeno (CO<sub>2</sub> 5 %, O<sub>2</sub> 95 %) y se reconstituyó con NaHCO<sub>3</sub> 2.20 g/l, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>. La osmolaridad se ajustó a 290 osm usando un osmómetro (VAPRO 5520, Wescor). Las rodajas se equilibraron en este medio al menos una hora antes de cualquier procedimiento.

#### c) Preparación de cortes para inmunofluorescencia.

Uno de los cerebelos se destinó a técnicas inmunohistoquímicas, por lo que se trató en paraformaldehído (PFA) al 4 % para su fijación (una noche a 4 °C). Después de 24 horas se cambió a una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % en tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se incluyó en bloques de Tissue-Tek OCT (Sakura) para la obtención de secciones sagitales del tejido de 30  $\mu$ m de grosor con un criostato (Leica). Las secciones se recogieron en una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol al 30 %, glicerol al 26 % y tampón fosfato 0.1 M pH 7.

### 3.4. Cultivos primarios de neuronas hipocámpales

Los cultivos de neuronas primarias disociadas fueron preparados siguiendo el protocolo descrito en Dotti et al., 1988 y Kaech y Banker, 2006. Se diseccionó el cerebro de embriones de ratones en el día 18 de gestación (E18) y se extrajo el hipocampo en medio HBSS (*Hanks Buffer Salt Solution  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  free*, GIBCO Invitrogen). El hipocampo se digirió con tripsina 0.25 % (GIBCO) durante 15 minutos a 37 °C. A continuación se disoció el tejido con ayuda de una pipeta pasteur, se resuspendió en medio MEM (Minimum Essential Media, GIBCO Invitrogen) conteniendo glucosa 20 % y suero de caballo 10 % (Horse Serum heat inactivated, Invitrogen) y se plaquearon las neuronas a una densidad de:

- 26 000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos para los registros de calcio
- 9000 células/cm<sup>2</sup> sobre cubreobjetos para inmunofluorescencia
- 20 000 células/cm<sup>2</sup> en placas para ensayos bioquímicos

Los cubreobjetos habían sido previamente esterilizados a 235 °C y tanto éstos como las placas fueron tratados con polilisina (Sigma, 1 y 0.1 mg/ml respectivamente) en tampón borato durante al menos 24 h.

Una vez adheridas las neuronas al sustrato después de tres horas, el medio se cambió a Neurobasal suplementado con B27 y Glutamax-I (GIBCO Invitrogen). Se realizaron cambios parciales de medio cada 3 días y a partir del octavo día de cultivo se eliminó el suplemento Glutamax para evitar la posible excitotoxicidad.

#### 3.4.1. Tratamientos en neuronas en cultivo

Las drogas añadidas al medio de cultivo en los diferentes experimentos y sus condiciones de uso se describen en la siguiente tabla.

Reactivo	Uso	Concentración	Solvente	Referencia
SM	Aumentar niveles de SM en membrana	40 $\mu$ M	Etanol	Sigma-Aldrich
BAPTA	Quelante de calcio	10 $\mu$ M	DMSO	Invitrogen
Apocinina	Antioxidante	0,5 mM	DMSO	Calbiochem
Vanadato	Inhibidor de PMCA	0,5 mM	Agua	Sigma-Aldrich
Valproato	HDACi	1 $\mu$ M 1,5 $\mu$ M	Agua	Sigma-Aldrich
SAHA	HDACi	4 $\mu$ M 8 $\mu$ M	DMSO	Sigma-Aldrich

### 3.5. Ensayos bioquímicos

#### 3.5.1. Preparación de extractos de membrana

Los homogenizados de tejido o de células se centrifugaron a 1500 *g* a 4 °C durante 10 minutos para descartar fragmentos no disgregados. A continuación el sobrenadante se centrifugó a 100 000 *g* a 4 °C durante una hora en una ultracentrífuga (BECKMAN TL-100) para obtener la fracción de membrana (precipitado), que se lavó varias veces con PBS y se resuspendió en el tampón correspondiente (MES para WB y HEPES-sacarosa para medidas de actividad).

#### 3.5.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en los homogenizados de tejido o de células se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific). Este método combina la reacción de las proteínas con iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (produciendo  $\text{Cu}^+$ , reacción de Biuret) con un reactivo altamente selectivo y sensible: el ácido bicinonínico. El resultado de esta reacción es un producto color púrpura que presenta absorbancia a 562 nm. La reducción de los cationes cobre está causada principalmente por tres residuos aminoácidos de las proteínas: cisteína, tirosina y triptófano. La concentración de proteína se calculó interpolando los datos de absorbancia a 562 nm en una recta

patrón obtenida en base a concentraciones conocidas crecientes de 20 a 2000  $\mu\text{g/ml}$  de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) diluida en agua.

### 3.5.3. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot)

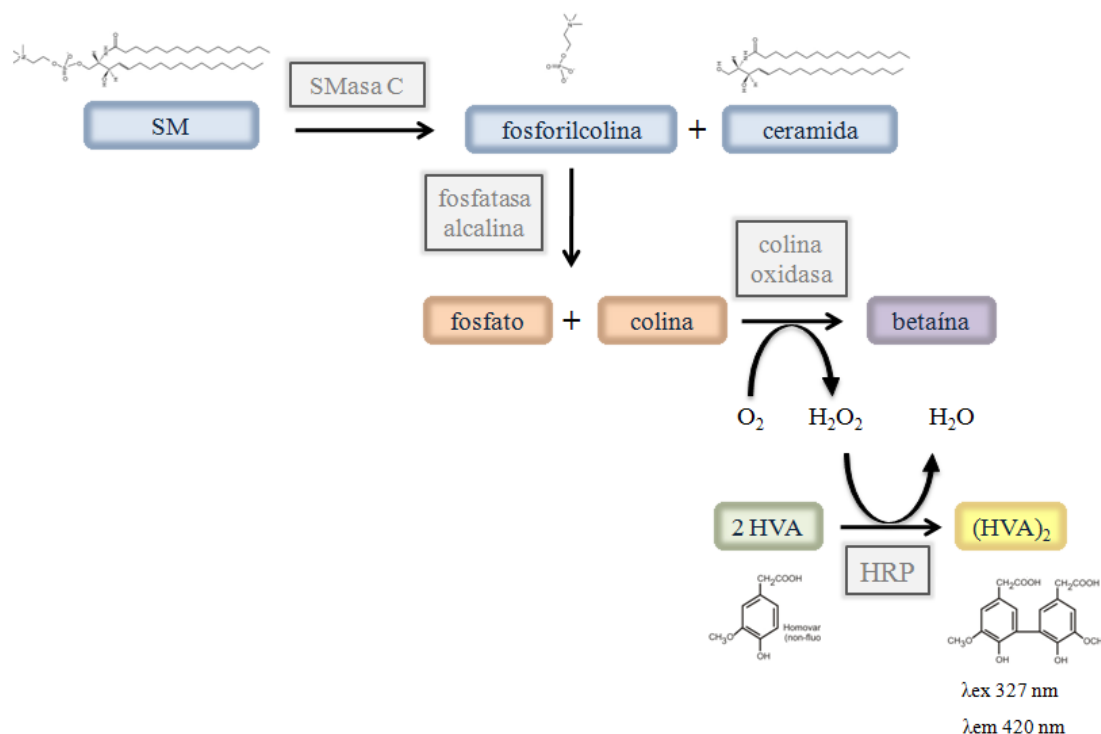
Los extractos proteicos se hirvieron a 99 °C durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis (Tris 25 mM pH 6.8, dodecil sulfato sódico (SDS) 1 %, glicerol 3.5 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.4 % y azul de bromofenol 0.04 %). Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad (300 mA durante 1 hora). Para comprobar la eficiencia de la transferencia las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau. A continuación se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5 % en PBS con Tween-20 0.1 % durante 45 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en medio de bloqueo toda la noche a 4 °C. Después de lavar las membranas 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween-20 0.1 % se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (Dako), diluidos en medio de bloqueo (1/5000), durante 45 minutos. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se visualizaron mediante el sistema ECL (PerkinElmer) en una cámara digital ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare) en condiciones de exposición no saturantes. Los valores de densitometría de las bandas producidas por cada anticuerpo se cuantificaron usando el software Quantity One (Bio-Rad) y se normalizaron con respecto a los valores obtenidos para los controles de carga: GAPDH,  $\alpha$ -tubulina o  $\beta$ -actina para extractos totales y vinculina o ATP6V1A para extractos de membrana.

### 3.5.4. Cuantificación de lípidos

#### a) Medida de SM.

La SM se midió usando un protocolo fluorimétrico, modificado a partir de Hojjati and Jiang, 2006. Los extractos de membrana (30  $\mu\text{g}$  y 15  $\mu\text{g}$  en el caso de muestras control y mutantes, respectivamente) se secaron en presencia del detergente no iónico Thesit (Sigma-Aldrich) para la completa disgregación de los lípidos de membrana usando nitrógeno y el precipitado se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua. Después se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción consistente en: Tris-HCl 50 mM pH 7.5,  $\text{MgCl}_2$  0.5 mM, peroxidasa 10 U/ml (Sigma-Aldrich), esfingomielinasa C 0.5 U/ml (Sigma-Aldrich), fosfatasa alcalina 10 U/ml (Sigma-Aldrich), colina oxidasa 1 U/ml (Sigma-Aldrich) y ácido homovanílico 1.2 mM (Sigma-Aldrich) y se incubó una hora a 37 °C, temperatura óptima para las enzimas de la mezcla. La SM presente en la muestra es degradada por la esfingomielinasa C en ceramida y fosforilcolina, que a su vez será desfosforilada por la fosfatasa alcalina. El producto resultante es sustrato de la colina oxidasa, cuya reacción produce peróxido de hidrógeno que en presencia de ácido homovanílico genera un producto que presenta fluorescencia a

420 nm cuando se excita a una longitud de onda de 327 nm (Figura 3.2). De esta manera la fluorescencia observada será proporcional a la cantidad de SM presente en la muestra.



**Figura 3.2.** Esquema de las reacciones en cadena en el ensayo fluorimétrico para la cuantificación de SM.

Después de la incubación de una hora la reacción se detuvo con 1 ml de tampón carbonato/EDTA y la señal se midió usando un fluorímetro (Aminco Bowman Series 2) y cubetas de cuarzo. Los valores de fluorescencia se interpolaron a partir de una curva patrón con concentraciones conocidas de SM y se refirieron a la cantidad de proteína de partida.

#### b) Medida de colesterol.

Para la medida de colesterol se usó el protocolo fluorimétrico Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen). Se partió de 6 µg de proteína en un volumen de 50 µl al que se añadieron otros 50 µl de mezcla de reacción compuesta por reactivo Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) 0.15 mM, HRP 1 U/ml y colesterol oxidasa 1 U/ml. La enzima colesterol oxidasa convierte este lípido en cetona produciendo peróxido de hidrógeno, que reacciona con el reactivo Amplex Red en presencia de HRP, produciéndose resorufina. Ésta presenta fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 571 nm con emisión a 585 nm (Figura 3.3).

Después de 30 minutos de incubación con la mezcla de reacción se midió la fluorescencia a las longitudes de onda mencionadas usando el equipo FLUOstar



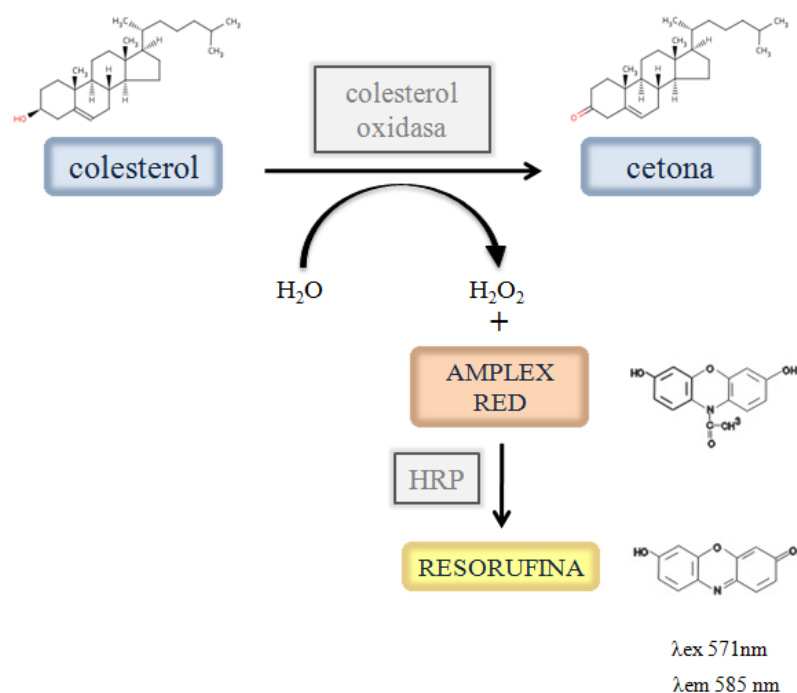


Figura 3.3. Ensayo fluorimétrico para la cuantificación de colesterol.

OPTIMA (BMG Labtech). La cantidad de colesterol se interpoló a partir de una curva patrón preparada con concentraciones conocidas de colesterol y se refirió a la cantidad de proteína de partida.

### 3.5.5. Medida de actividad PMCA

La actividad enzimática se midió usando el protocolo descrito en Sepúlveda et al., 2005. Este método consiste en una serie de reacciones acopladas que terminan en la oxidación de NADH a  $NAD^+$ . De esta manera, la reacción se sigue por la disminución de absorbancia a 340 nm, al reducirse la cantidad de NADH. En concreto, el ADP formado por las ATPasas al bombear calcio es usado por la piruvato quinasa en presencia de fosfoenolpiruvato, produciéndose piruvato. Éste es reducido por la lactato deshidrogenasa a lactato, oxidándose el cofactor NADH a  $NAD^+$ . Se partió de extractos de membrana de hipocampo y se utilizaron 40  $\mu g$  de proteína a los que se añadió 1 ml de la siguiente mezcla de reacción: HEPES-KOH 50 mM pH 7.4, KCl 100 mM,  $Na_3N$  5 mM,  $MgCl_2$  2 mM,  $CaCl_2$  100  $\mu M$ , NADH 0.22 mM (Roche), fosfoenolpiruvato 0.42 mM (Sigma-Aldrich), piruvato quinasa 10 U (Roche) y lactato deshidrogenasa 28 U (Roche). La concentración de calcio libre se ajustó añadiendo a la mezcla cantidades determinadas del quelante de calcio (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) (BAPTA, Sigma-Aldrich), preparado en  $NaHCO_3$  0.3 N, que se calcularon usando el software BAD (Maxche-

lador). La mezcla se incubó a 37 °C durante 4 min. En los experimentos indicados se añadió además saponina al 0.01 % a las muestras para disgregar las membranas. La reacción se disparó mediante la adición de ATP 1 mM (Sigma-Aldrich) y se midió la absorbancia durante 25-30 segundos (tiempo en el que la pendiente de la recta es estable). La medida de la pendiente de la recta de disminución de absorbancia debido a la reducción de NADH en la muestra es la actividad total de las ATPasas. A continuación se añadió tapsigargina 100 nM, un inhibidor de SERCA, y se midió de nuevo la pendiente. Después se añadió vanadato 2  $\mu$ M (Sigma-Aldrich), un inhibidor de PMCA, y por último EGTA 3 mM (Sigma-Aldrich), para medir la actividad de las  $Mg^{2+}$ -ATPasas. La actividad total de las  $Ca^{2+}$ -ATPasas (SERCA, PMCA y SPCA) se calculó restando la actividad de las  $Mg^{2+}$ -ATPasas (con EGTA) a las actividades totales obtenidas tras disparar la reacción. La actividad SERCA se obtuvo restando la actividad en presencia de tapsigargina a la actividad total de las  $Ca^{2+}$ -ATPasas. La actividad de SPCA se calculó por la diferencia entre la actividad en presencia de vanadato menos la actividad de las  $Mg^{2+}$ -ATPasas. Por último, la actividad PMCA se obtuvo restando la actividad en presencia de EGTA y la de SPCA a la actividad en presencia de tapsigargina.

### 3.5.6. Aislamiento de rafts lipídicos

El aislamiento de rafts lipídicos se basó en la insolubilidad de las membranas de rafts en detergentes no iónicos en frío (Brown and Rose, 1992) que permite su flotación en gradientes de sacarosa. Las membranas insolubles correspondientes a los rafts se recogen en las densidades menores (fracciones 1-7 del gradiente) mientras que las membranas solubilizadas permanecen en las fracciones de densidades más pesadas (fracciones 8-13 del gradiente). En nuestros experimentos se mezclaron 300  $\mu$ g de proteína de extractos de hipocampo con 1 ml de tampón TNE (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM) con Tritón X-114 1 % (Sigma-Aldrich) e inhibidores de proteasas (Roche) y se incubó en agitación durante 40 minutos a 4 °C. Las muestras se mezclaron con 2.25 ml de sacarosa al 80 % en tampón TNE, sobre los que se añadieron 6 ml de sacarosa al 35 % y por último 3 ml al 5 % para formar un gradiente de densidad. A continuación se centrifugaron las muestras a 72500 *g* durante 19 horas a 4 °C usando una ultracentrífuga BECKMAN Coulter Optima L-100 XP (rotor SW40). Se tomaron fracciones de 1 ml. Las proteínas se precipitaron usando ácido tricloroacético al 40 % (TCA, Sigma-Aldrich), que se incubó en hielo durante 20 minutos. Posteriormente se centrifugaron las muestras con el ácido durante 30 minutos a 18000 *g* a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol absoluto frío dos veces, centrifugando en las mismas condiciones anteriores. Finalmente el precipitado de proteínas se dejó secar y se resuspendió en SDS 0.1 % y tampón de carga para analizar por la técnica de western blot.

## 3.6. Análisis por microscopía

### 3.6.1. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en muestras humanas

Las secciones de cerebros se desparafinaron y se hidrataron con xileno durante 10 minutos (Merck) y con concentraciones decrecientes de etanol (100 %, 96 % y 70 %, durante 2 minutos).

Para la inmunohistoquímica se inactivó la peroxidasa endógena incubando con agua oxigenada al 1 % en metanol (Merck) durante 30 minutos. Después de un lavado con agua destilada se procedió al desenmascaramiento de epítomos con un tampón citrato de sodio (ácido cítrico 10 mM pH 5.9), hirviendo durante 5 minutos y manteniendo los cortes a temperatura media en el microondas durante 10 minutos más. Posteriormente se atemperaron las secciones unos 20 minutos en frío y tras lavarlos con agua y PBS 1X se bloquearon con seroalbúmina bovina 1 % (BSA, Sigma-Aldrich), FBS 5 % (suero bovino fetal, Sigma-Aldrich), NGS 2 % (suero de cabra, Sigma-Aldrich) y Tritón X-100 0.1 % en PBS 1X durante 45 minutos. El anticuerpo primario NeuN se incubó en esta solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS y las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-ratón durante 1 hora. Se lavaron nuevamente las secciones 3 veces durante 10 minutos con PBS y se incubaron 1 hora con el complejo Avidina-peroxidasa (ABC) que reconoce las moléculas de biotina acopladas al anticuerpo secundario. Tanto el anticuerpo secundario como el complejo ABC se incluyen en el Kit Elite Vectastain (Vector Laboratorios). Finalmente, se realizaron 2 lavados de 10 minutos con PBS y se procedió al revelado con una solución de DAB (3,3'-diaminobencidina tetrahidroclorada; una tableta en 10 ml de PBS y 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %). El DAB se oxida en presencia de agua oxigenada originando un precipitado de color marrón. Cuando el tejido presentó una coloración suficiente, se detuvo la reacción pasando las secciones a agua destilada. Por último, se procedió a deshidratar las secciones con etanol a concentraciones crecientes (70 %, 96 % y 100 %, durante 2 minutos) y xileno (como mínimo 2 minutos) y se montaron en portaobjetos. Como medio de montaje se empleó FluorSave (Calbiochem). Las imágenes se tomaron con una cámara ccd monocroma y color SPOT RT Slider (Diagnostic) acoplada a un microscopio Axiovert 200 (Zeiss) tras aplicar el ajuste de Kohler.

Para la inmunofluorescencia se procedió al desparafinado y deshidratado de los cortes, al desenmascaramiento de epítomos y al bloqueo como se ha descrito anteriormente. Tras la incubación del anticuerpo primario MAP2 o calbindina durante toda la noche en la solución de bloqueo las secciones se incubaron con el secundario de cabra anti-pollo Alexa-555 (Invitrogen) o cabra anti-conejo Alexa-488 (Invitrogen) durante 1 hora. Las secciones se lavaron con PBS 1X y se deshidrataron y montaron como se ha descrito en el caso de la inmunohistoquímica. Las imágenes se tomaron usando un microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio

invertido Axiovert200 M (Zeiss).

### 3.6.2. Inmunofluorescencia en neuronas en cultivo

Las neuronas hipocampales cultivadas sobre cubreobjetos se fijaron con PFA 4 % en PBS durante 10 minutos. Posteriormente se incubaron con cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 50 mM durante 20 minutos para evitar la autofluorescencia. Después se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1 % durante 10 minutos y se bloquearon con 2 % albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) y 5 % suero fetal bovino (FBS) en PBS durante 1 hora. Tras la incubación con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios (como se describe en detalle a continuación) se añadió DAPI ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10 minutos) para marcar los núcleos. Por último los cubreobjetos se montaron sobre portas usando el medio Prolong Gold (Invitrogen). Las imágenes se tomaron usando un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color y se cuantificaron usando el software ImageJ.

Como controles se montaron cubreobjetos sin ningún anticuerpo, toxina o reactivo, o solamente con el anticuerpo secundario correspondiente.

#### a) Marcaje de SM con lisenina.

El marcaje de SM en la membrana plasmática se llevó a cabo mediante tinción con lisenina, una toxina derivada de la lombriz *Eisenia foetida* que es capaz de unir específicamente este esfingolípido (Yamaji et al., 1998). En este caso se evitó el uso de detergentes para impedir la permeabilización de las células y obtener así un marcaje exclusivamente de membrana. La lisenina (Peptanova) se incubó durante toda la noche a una concentración de  $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  y a  $4^\circ\text{C}$ . Después de tres lavados con PBS de 10 min, las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-suero policlonal (Peptanova) que reconoce la lisenina y por último con un anticuerpo secundario, burro anti-conejo, conjugado con el fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen) en las mismas condiciones.

#### b) Detección de gránulos de lipofuscina.

La lipofuscina es autofluorescente, de manera que no se necesita ningún marcador para visualizarla. Utilizamos un marcaje con DAPI ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10 minutos, Merck) para identificar los núcleos celulares. Las muestras se analizaron en el microscopio invertido.

#### c) Marcaje de especies reactivas de oxígeno con DHR.

La dihidrorodamina-123 (Life technologies) es un reactivo que puede atravesar las membranas celulares y reaccionar con las ROS produciendo rodamina. Éste es un compuesto fluorescente que presenta una longitud de onda de excitación y de emisión máximas a 500 y 536 nm, respectivamente.

En este caso, las neuronas sobre cubreobjetos se incubaron con DHR  $10 \mu\text{M}$  en el medio de cultivo durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron y se fijaron como se ha descrito anteriormente y se analizaron en el microscopio invertido.

### 3.6.3. Inmunofluorescencia en rodajas de hipocampo de 400 $\mu\text{m}$

Las rodajas preparadas y equilibradas al menos durante una hora en ACSF se incubaron con DHR 10  $\mu\text{m}$  durante 20 minutos en continua oxigenación ( $\text{CO}_2$  5 %,  $\text{O}_2$  95 %). Después de los lavados (10 min cada uno) en este mismo medio las rodajas se fijaron con PFA 4 % toda la noche. Al día siguiente se permeabilizaron con Tritón X-100 0.1 % durante 20 minutos y se incubaron con DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10 minutos, se lavaron en PBS y se montaron en portaobjetos con medio Prolong Gold.

Los controles negativos (rodajas que no se incubaron con DHR pero siguieron el mismo procesamiento que las tratadas) se usaron además para la detección de lipofuscina (autofluorescente).

Las imágenes se tomaron en un microscopio multifotón: microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 y LSM510 acoplados a un microscopio invertido AxioObserver y a un vertical AxioImager M1 (Zeiss), respectivamente.

### 3.6.4. Inmunofluorescencia en cortes de cerebelo

Los cortes de cerebelo de 30  $\mu\text{m}$  de grosor se permeabilizaron con Tritón X-100 1 % y se incubaron con el anticuerpo contra calbindina en solución de bloqueo durante dos días. La incubación con el secundario fluorescente se realizó durante una noche, y posteriormente los cortes se marcaron con DAPI (10 min) y se montaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Se contaron las neuronas positivas para calbindina (células de Purkinje) en los lóbulos posteriores del cerebelo por unidad de área.

## 3.7. Registro de los niveles de calcio

Para registrar los niveles de calcio las neuronas se incubaron con Fura2-AM (Molecular Probes) en presencia de ácido plurónico F.127 (Invitrogen), un detergente que produce poros en las membranas y facilita la entrada del Fura2-AM, en un medio HCSS libre de calcio ( $\text{NaCl}$  120 mM,  $\text{KCl}$  5.4 mM,  $\text{MgCl}_2$  25 mM, HEPES pH 7.4) con glucosa 2.5 mM durante 30 minutos a 37 °C. Después se lavaron durante 30 minutos con HCSS con calcio ( $\text{CaCl}_2$  2 mM) y glucosa 2.5 mM. Los cubreobjetos se montaron en una cámara cerrada adaptada para el microscopio. La fluorescencia del Fura2-AM se siguió usando una excitación a 340 nm y a 380 nm de forma alternativa y un filtro de emisión a 510 nm, con el objetivo neofluar 40 X/0.75 (Zeiss) a una temperatura controlada de 37 °C. La adición de  $\text{KCl}$  30 mM se realizó en forma de bolo. Los análisis de los cambios en las concentraciones de calcio se expresaron en nM según la proporción de intensidad de fluorescencia a 340 nm ( $F_{340}$ ) y 380 nm ( $F_{380}$ ;  $F_{340}/F_{380}$ ), tal y como se describe en Grynkiewicz et al., 1985, mediante la siguiente fórmula:

$$[Ca^{2+}] = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times \beta \times Kd$$

Donde las calibraciones se obtuvieron en presencia del ionóforo de calcio Br-A23 (Sigma-Aldrich), preincubando con ( $R_{min}$ ) o sin ( $R_{max}$ ) EGTA 2 mM.

La adquisición de la imagen y su análisis se realizó mediante el software Aquacosmos 2.5 (Hamamatsu). Los resultados se corrigieron según la autofluorescencia, que se midió mediante la adición de digitonina y  $MnCl_2$  4 mM.

Para los experimentos en un medio de perfusión, la adición de KCl se llevó a cabo usando un medio HCSS isosmótico en el que parte del NaCl se sustituyó por KCl (NaCl 90 mM, KCl 35.4 mM,  $MgCl_2$  0.8 mM, HEPES pH 7.4) con un flujo de 1.5 ml/min. Se realizaron tres adiciones de KCl isosmótico de 1 minuto, separadas entre sí por lavados de 10 minutos, durante un tiempo total de registro de 30 minutos. Para impedir la actividad de NCX el sodio fue sustituido por colina 112.5 mM (Merck). En estos experimentos los datos se representaron como la relación  $F_{340}/F_{380}$  (R) respecto a este valor en el tiempo inicial ( $R_0$ ;  $R/R_0$ ).

### 3.8. Tratamiento de los ratones con SAHA

La insolubilidad en agua del inhibidor de las deacetilasas de histonas SAHA o vorinostat (MedChem Express) obligó a acomplejarlo con 5 equivalentes molares de 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HOP- $\beta$ -CD, Sigma-Aldrich) como se describe en Hockly et al., 2003. Se preparó una solución de HOP- $\beta$ -CD a 18 g/l en agua y a ésta se añadieron 0.67 g de SAHA que se calentaron a 65 °C hasta conseguir su completa solubilización. Rápidamente se enfrió en hielo y se filtró para su administración en el agua de bebida de los ratones. Teniendo en cuenta que un ratón de 20 g de peso consume unos 3 ml de agua por día se calculó la cantidad de solución para que las dosis recibidas fueran de 100 mg por kg de peso. Esta dosis tiene efectos en la acetilación de histonas en cerebro sin producir efectos tóxicos en los animales como pérdida de peso (Hockly et al., 2003). En nuestro caso, el agua de bebida se cambió una vez por semana. El peso de los ratones se controló también semanalmente.

### 3.9. Tests de comportamiento

Los test de comportamiento se realizaron en una celda del animalario acondicionada para este tipo de procedimientos, donde los animales fueron trasladados una semana antes del inicio del ensayo para su adaptación.

### 3.9.1. Tests de coordinación motora: Rotarod

Este test se realizó usando el aparato Mouse Rota-rod (Ugo Basile). Cada ratón fue entrenado durante dos días: el primer día se hicieron 4 sesiones de 1 minuto a velocidad fija de 4 r.p.m, con intervalos de 1 hora; el segundo día se aumentó el tiempo a 2 minutos con aceleración de 4 r.p.m a 8 r.p.m. Una vez realizados los entrenamientos, el tercer día se procedió a la realización de las pruebas, que se desarrollaron durante 5 minutos con una aceleración progresiva de 4 a 40 r.p.m. En total se hicieron 4 pruebas y se contó el tiempo que tardó cada ratón en caer.

### 3.9.2. Tests de memoria y aprendizaje: Prueba de la Y (Y-maze)

Esta prueba se realizó según se describe en Cognato et al., 2010. Se usó una estructura en forma de Y con paredes opacas de 8 cm de altura. Primero se depositó a cada ratón dentro de la estructura y se le permitió explorar dos de los brazos durante ocho minutos, estando el tercero cerrado. Después de una hora, cada ratón se colocó de nuevo en el aparato pero esta vez con el tercer brazo abierto. Se cuantificó el tiempo que cada ratón pasaba explorando el brazo nuevo y se expresó como porcentaje respecto al tiempo total de exploración.

## 3.10. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con el programa SPSS (IBM). En las gráficas se representan como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media). Los asteriscos representan  $P$  valores como se indica a continuación: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 3.10.1. Comparaciones simples

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk de normalidad de distribución de la muestra y se aplicó la prueba  $t$  de Student (para las muestras con distribución normal) o la  $U$  de Mann-Whitney (muestras no paramétricas).

### 3.10.2. Comparaciones múltiples

Los resultados con distribución normal se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una o de dos vías, según el caso, seguidas de un test *post hoc* de diferencia significativa mínima (MSD, para muestras con varianzas iguales) o de Games-Howell (muestras con varianzas diferentes). La igualdad de la varianza se analizó con la prueba de Levene.

En los casos con distribución no paramétrica se realizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida del test  $U$  de Mann-Whitney, al que se aplicó la corrección de Bonferroni.



## 4. RESULTADOS

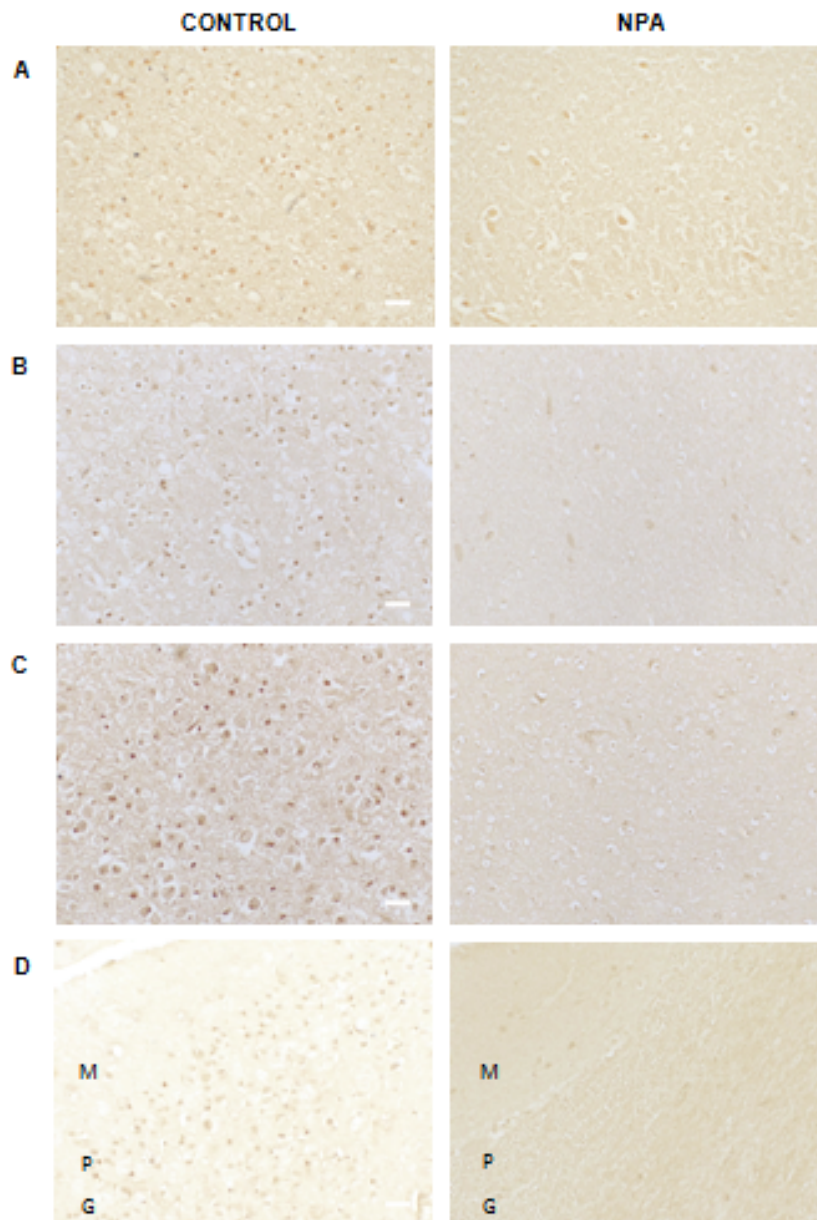
### 4.1. El estrés oxidativo caracteriza el hipocampo de pacientes de NPA y de ratones ASM-/- que son modelo para la enfermedad.

#### 4.1.1. Neurodegeneración masiva y acumulación de gránulos de lipofuscina en el cerebro de un paciente de NPA.

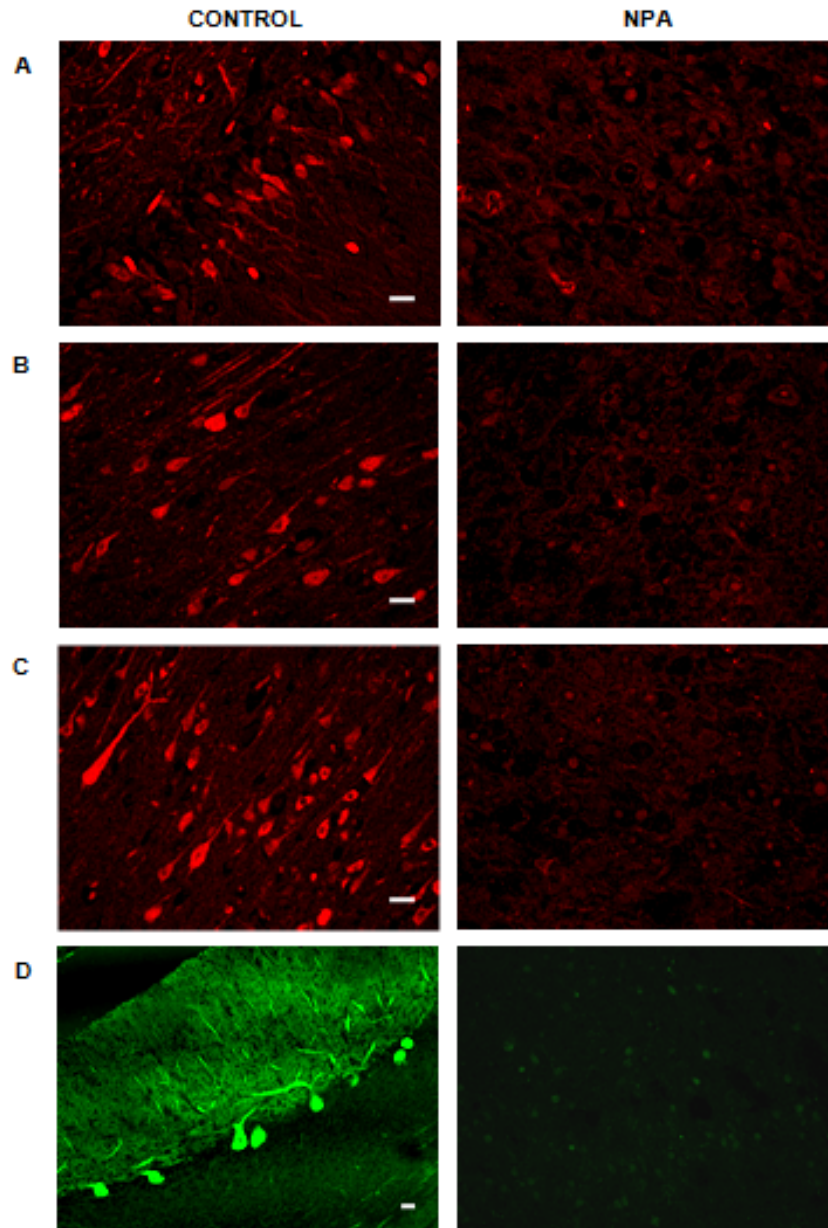
Dada la baja incidencia de esta enfermedad los estudios en muestras de pacientes han sido muy limitados. Gracias a la donación de tejido por parte de la fundación Wylder Nation y de la Fundación Cien pudimos comparar distintas áreas del cerebro de un niño enfermo y un niño control de edades similares (3 y 2 años de edad, respectivamente).

Nuestro primer objetivo fue analizar la muerte neuronal, que en los ratones modelo para la enfermedad es evidente en una población específica de neuronas del cerebelo: las neuronas de Purkinje (Horinouchi et al., 1995; Otterbach et al., 1995; Macauley et al., 2008). La inmunotinción para las proteínas específicas de neuronas NeuN (*Neuronal Nuclei*) (Mullen et al., 1992) (Figura 4.1) y MAP2 (Proteína Asociada a Microtúbulos 2) (Caceres et al., 1984) (Figura 4.2) reveló que la muerte neuronal en el paciente de NPA era muy significativa no sólo en el cerebelo sino también en otras áreas del encéfalo como el hipocampo y la corteza temporal y parietal. Dado que las neuronas de Purkinje no se marcan con el anticuerpo MAP2 en el área del cerebelo realizamos además una tinción con calbindina, marcador específico de estas neuronas (Fournet et al., 1986), y pudimos comprobar la muerte de este tipo neuronal en el caso NPA (Figura 4.2). El análisis con hematoxilina-eosina en el núcleo de tracto solitario del bulbo raquídeo, el área cerebral donde pudimos detectar más neuronas supervivientes, reveló la presencia de depósitos microgranulares refringentes intraneuronales en el paciente NPA que no aparecían en el cerebro control (Figura 4.3.A y 4.3.B). La autofluorescencia de estos depósitos los identificó como gránulos de lipofuscina (Figura 4.3.C). Éstos son agregados de proteínas oxidadas y lípidos peroxidados que no pueden ser degradados ni expulsados por las

células y que indican altos niveles de estrés oxidativo (Sohal and Brunk, 1989).



**Figura 4.1. Neurodegeneración en distintas áreas del cerebro y en el cerebelo del paciente NPA.** Imágenes representativas de marcaje inmunohistoquímico con un anticuerpo anti-NeuN en secciones de hipocampo (A), corteza parietal (B), corteza temporal (C) y cerebelo (D) de la muestra control y del paciente NPA. M = capa molecular; P = capa de neuronas de Purkinje; G = capa granular. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

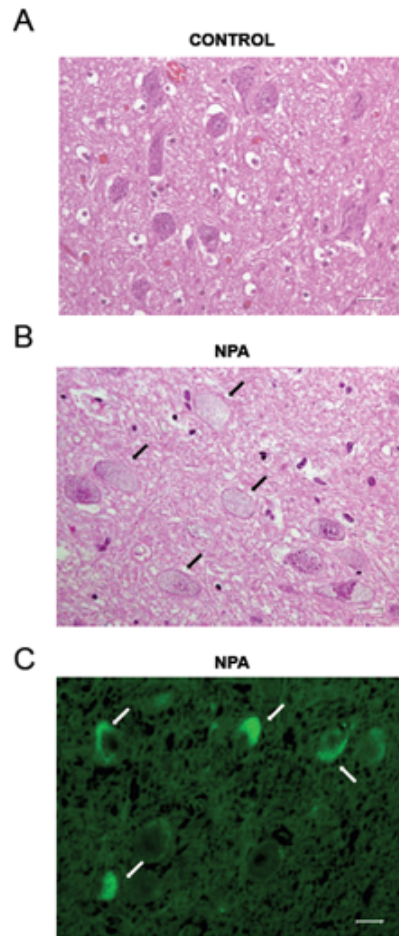


**Figura 4.2. Neurodegeneración en las principales áreas del cerebro y en el cerebelo del paciente NPA.** Imágenes representativas de marcaje con un anticuerpo anti-MAP2 en secciones de hipocampo (A), corteza parietal (B) y corteza temporal (C) y con anti-calbindina en cerebelo (D) de la muestra control y del paciente NPA. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

---

#### 4.1.2. Las neuronas de ratones ASM-/- presentan gránulos de lipofuscina debido a la acumulación de SM.

La detección en el cerebro del paciente de NPA de muerte neuronal masiva junto a signos de estrés oxidativo sugiere que éste último puede ser un factor patológico



**Figura 4.3. Las neuronas de un paciente NPA presentan somas expandidos llenos de agregados de lipofusina.** (A, B) Imágenes representativas del núcleo medular (núcleo del tracto solitario) de un cerebro control (A) y NPA (B) marcados con hematoxilina-eosina. La mayoría de neuronas del paciente NPA pero no del control presentan somas expandidos ocupados por depósitos microgranulares refringentes (indicados por las flechas). Barra de escala = 25  $\mu$ m. (C) Imágenes de microscopía de fluorescencia del núcleo del tracto solitario del paciente NPA de secciones no tenidas. Los depósitos microgranulares presentan una intensa fluorescencia (indicados por las flechas), característica de acúmulos de lipofusina. Barra de escala = 25  $\mu$ m.

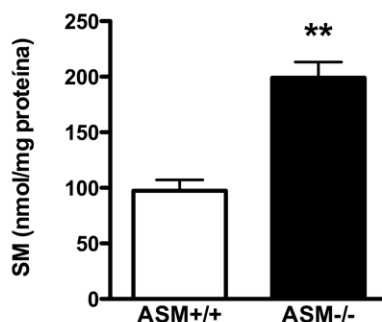
clave que contribuya a la neurodegeneración. Para confirmar este punto decidimos comparar ratones ASM<sup>-/-</sup>, que son modelo para NPA, con ratones ASM<sup>+/+</sup> a los 4 meses. A esta edad los primeros signos de la enfermedad han empezado a manifestarse en el cerebro del ratón ASM<sup>-/-</sup> detectándose un incremento en los niveles de SM y degeneración de células de Purkinje del cerebelo (Sarna et al., 2001).

Decidimos enfocar nuestros análisis en el hipocampo ya que es un área del cerebro especialmente sensible al estrés oxidativo (Cardozo-Pelaez et al., 2000). En primer lugar confirmamos mediante ensayo enzimático el incremento de los niveles de SM

## RESULTADOS

---

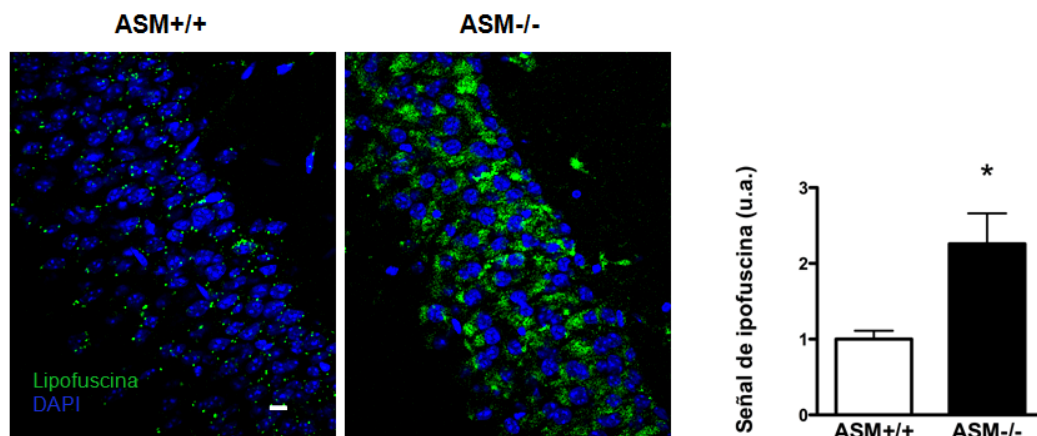
en extractos de hipocampo de ratones ASM-/- . La cantidad de SM era dos veces mayor que en los ratones ASM+/+ (Figura 4.4).



**Figura 4.4. Los ratones ASM-/-, modelo para NPA, presentan acumulación de SM a los 4 meses de edad en el hipocampo.** Gráfica representativa de la media  $\pm$  SEM de los niveles de SM (en nmol/mg de proteína) medidos en extractos de hipocampo de ratones de 4 meses de edad.  $n=5$ ,  $t$  de Student,  $P=0.001$ .

---

Para determinar si los agregados de lipofuscina también se acumulan en el cerebro de los ratones ASM-/- se prepararon rodajas de hipocampo de 400  $\mu\text{m}$  de grosor y se midió por microscopía la señal autofluorescente en la región de somas de neuronas piramidales de CA1. La cuantificación de esta señal evidenció que los ratones modelo para NPA presentan 2.2 veces más gránulos de lipofuscina que los ratones ASM+/+ (Figura 4.5). Para establecer si el incremento en los niveles de SM es directamente responsable de este efecto se prepararon neuronas hipocámpales en cultivo de embriones de ratones ASM+/+ a las que se les añadió este esfingolípido. La incubación con 40  $\mu\text{M}$  SM resultó en su incorporación a la membrana como comprobamos mediante tinción con lisenina, una toxina que une específicamente este lípido (Yamaji et al., 1998), en condiciones en las que se evitó el uso de detergentes para no permeabilizar las células. Los niveles de SM en membrana aumentaron 1.9 y 3.2 veces tras 24 y 48 horas de incubación, respectivamente (Figura 4.6). Después del tratamiento las neuronas se analizaron por microscopía para detectar los agregados fluorescentes y se cuantificó el porcentaje de neuronas que los contenían respecto al número total de células. La adición de SM aumentó un 70% el número de neuronas con agregados de lipofuscina a las 48 horas de incubación (Figura 4.7). Para confirmar que este efecto estaba mediado por estrés oxidativo se usó el antioxidante apocinina que inhibe a las NADPH oxidasas (Simons et al., 1990) generadoras de ROS. La apocinina se añadió 30 minutos antes de la adición de SM y se mantuvo en el medio durante todo el período de incubación con el lípido. El tratamiento con este antioxidante evitó el incremento de gránulos de lipofuscina provocado por la SM (Figura 4.7).



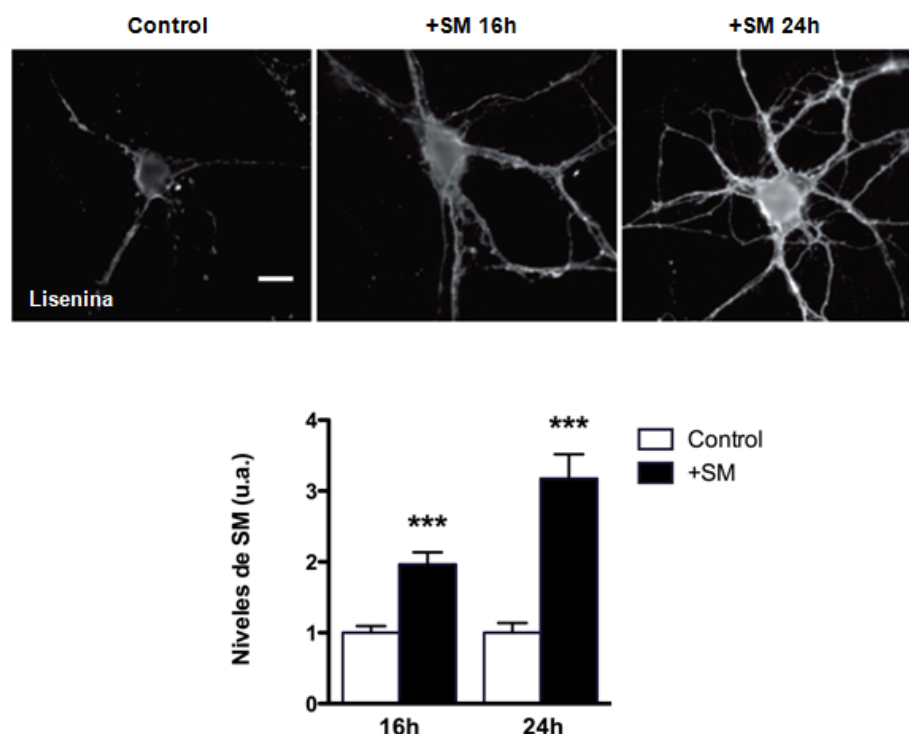
**Figura 4.5. Acumulación de gránulos de lipofuscina en ratones ASM-/- en la región CA1 del hipocampo.** Imágenes representativas de la señal autofluorescente (verde) correspondiente a lipofuscina y al marcaje con DAPI (azul) en la región CA1 del hipocampo de ratones control y ASM-/- de 4 meses de edad. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal autofluorescente por unidad de área.  $n = 5$ ,  $t$  de Student,  $P = 0.047$ . Barra de escala =  $10 \mu\text{m}$ .

### 4.1.3. Las neuronas ASM-/- presentan altos niveles de ROS debido al incremento de SM.

La aparición de gránulos de lipofuscina es una consecuencia del estrés oxidativo. Para analizar este último de una manera más directa se midieron los niveles de ROS mediante dihidrorodamina-123 (DHR). Las células son permeables a este reactivo que una vez que atraviesa la membrana plasmática reacciona con los ROS produciendo rodamina, un compuesto fluorescente que se localiza en la mitocondria (Kinsey et al., 1987). Como estas reacciones sólo tienen lugar en tejido vivo se prepararon rodajas de hipocampo de ratones ASM-/- y ASM+/+ de 4 meses de edad y se mantuvieron en fluido cerebroespinal artificial (ACSF) con oxigenación durante el marcaje con DHR. La cuantificación de la señal fluorescente correspondiente a rodamina en los somas neuronales del área CA1 del hipocampo reveló un incremento de 1.8 veces en los niveles de ROS en los ratones ASM-/- respecto a los ASM+/+ (Figura 4.8).

Para confirmar los elevados niveles de ROS en las neuronas hipocámpales deficientes en ASM y determinar su relación con la SM recurrimos de nuevo a los cultivos primarios derivados de ratones ASM-/- y ASM+/+. Las neuronas hipocámpales ASM-/- maduras cultivadas durante 12 días (12 DIV) presentaron 1.5 veces más SM en la membrana que las neuronas ASM+/+ como se detectó por tinción con lisenina (Figura 4.9). El marcaje con DHR en neuronas ASM-/- determinó que los niveles de ROS eran 1.4 veces superiores respecto a las neuronas ASM+/+ (Figura 4.10). Para determinar si la acumulación de SM es responsable del aumento de ROS, las

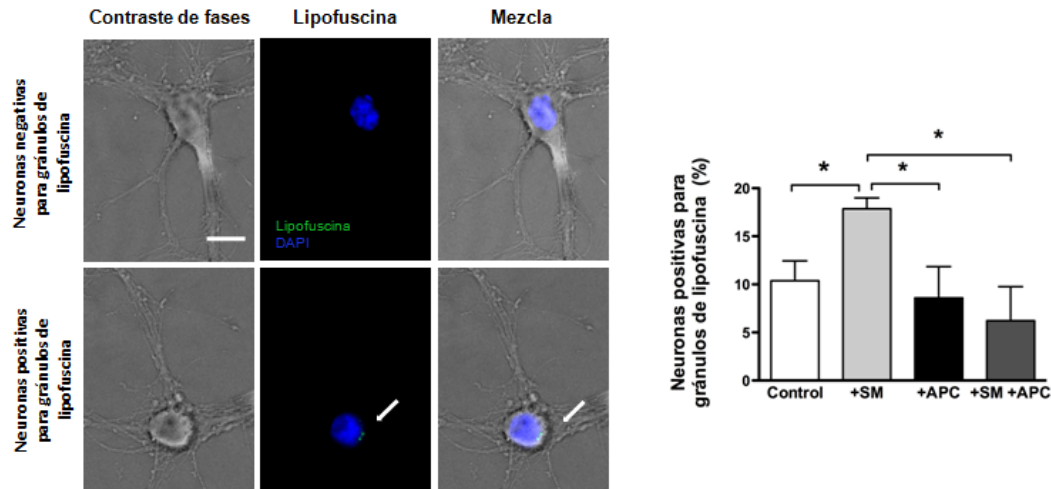




**Figura 4.6. Acumulación de SM en la membrana plasmática de neuronas hipocámpales de ratones ASM+/+ tras la adición exógena del lípido al medio de cultivo.** Imágenes representativas de la tinción con lisenina, marcador específico de SM, en membrana plasmática de neuronas hipocámpales en cultivo no permeabilizadas, tras 16 y 24 horas de la adición del lípido al medio a 12 DIV. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de fluorescencia debida a lisenina en neuronas tratadas y sin tratar.  $n = 3$  cultivos independientes,  $t$  de Student,  $P_{16h} = 0.0006$ ;  $P_{24h} = 0.0002$ .

neuronas hipocámpales ASM+/+ en cultivo se incubaron con el lípido durante 16 h y se realizó el marcaje con DHR. En estas condiciones los niveles de SM se incrementaron en las neuronas ASM+/+ hasta niveles parecidos a los encontrados en neuronas ASM-/- (ver Figuras 4.6 y 4.9) y los niveles de ROS en las neuronas tratadas aumentaron un 25 % respecto a las no tratadas (Figura 4.11). Además, el tratamiento con el antioxidante apocinina evitó el aumento de ROS provocado por el lípido (Figura 4.11).

Todos estos datos demuestran que el incremento de SM induce estrés oxidativo reflejado en el aumento de ROS y de gránulos de lipofusina en neuronas hipocámpales de ratones ASM-/-.



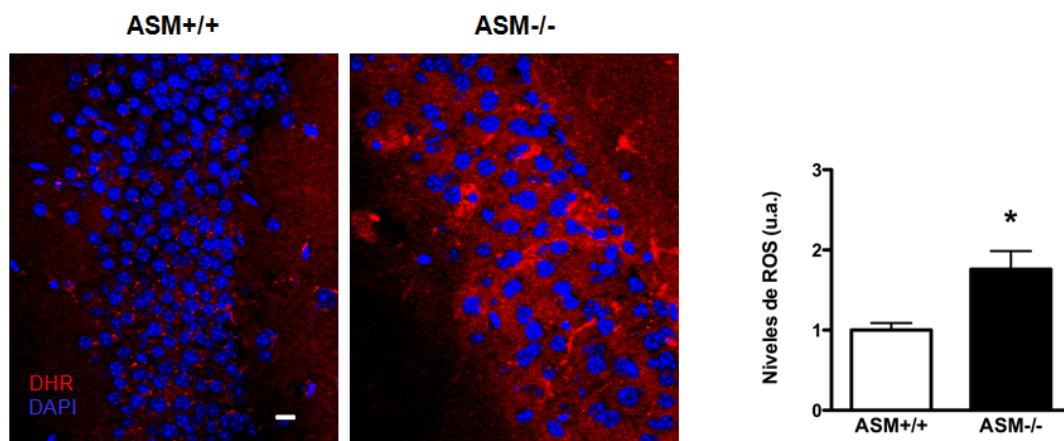
**Figura 4.7. Aumento del número de neuronas positivas para gránulos de lipofuscina tras la adición de SM debido a estrés oxidativo.** Imágenes representativas de contraste de fases, autofluorescencia (verde) y DAPI (azul) y la mezcla de ambas, de neuronas hipocámpales en cultivo que presentan o no gránulos de lipofuscina. Los agregados autofluorescentes de lipofuscina son perinucleares y se señalan con flechas blancas. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM del porcentaje de neuronas que presentan gránulos de lipofuscina respecto al número total de células en condiciones control, tratadas con SM, con el antioxidante apocinina (APC) o con ambos.  $n = 100$  neuronas de 4 cultivos independientes, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima,  $P_{ctl/sm} = 0.048$ ,  $P_{sm/apc} = 0.039$ ,  $P_{sm/sm+pc} = 0.014$ .

## 4.2. Mecanismo molecular: la deficiente actividad de PMCA que altera la homeostasis del calcio causa el estrés oxidativo en neuronas ASM-/-.

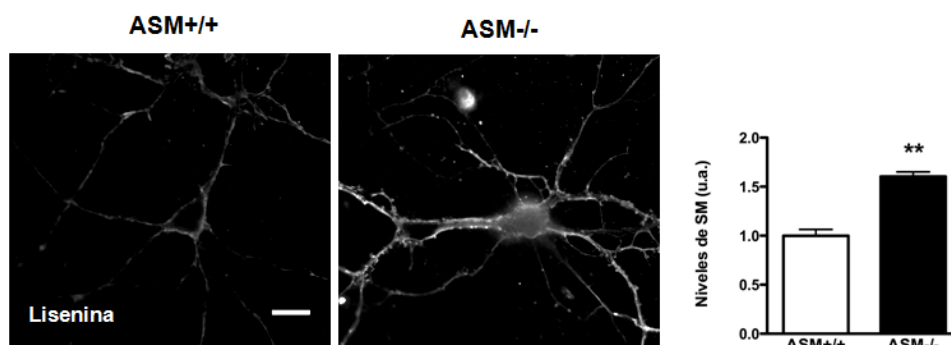
### 4.2.1. El aumento de los niveles de ROS en neuronas ASM-/- se debe al incremento del calcio intracelular.

Una de las principales fuentes de estrés oxidativo es la alteración en los niveles de calcio intracelular (Wang and Michaelis, 2010) (Gleichmann and Mattson, 2011). Para estudiar si este era el caso de los ratones modelo para la enfermedad NPA se prepararon cultivos de neuronas hipocámpales ASM+/+ y ASM-/- y se incubaron con BAPTA-AM, un quelante selectivo de calcio (Tymianski et al., 1994), durante 16 horas. Una vez en el interior de la célula, las esterasas cortan el grupo acetoximetil ester (AM), impidiendo la salida del quelante. Después se midieron los niveles de



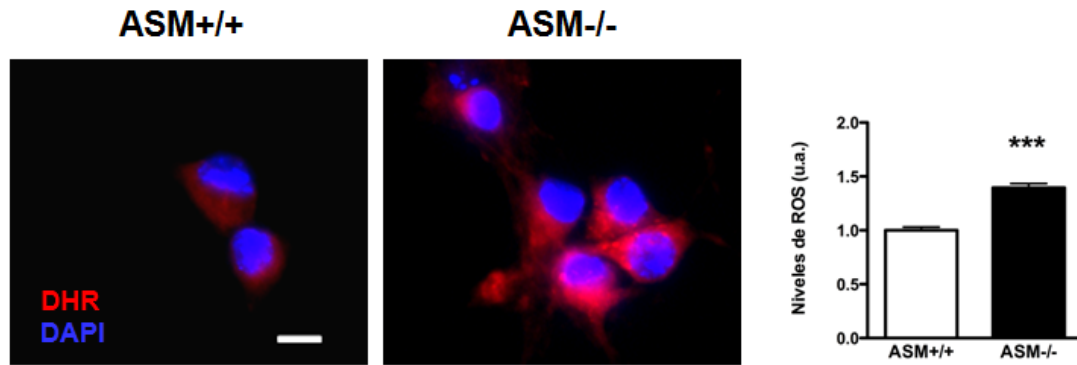


**Figura 4.8. Presencia de estrés oxidativo en el hipocampo de ratones ASM-/-.** Imágenes representativas de la señal fluorescente correspondiente a DHR (rojo), marcador de ROS, y DAPI (azul) en CA1 de rodajas de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- de 4 meses de edad. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de DHR por unidad de área en ambos grupos.  $n = 5$ ,  $t$  de Student  $P = 0.035$ .

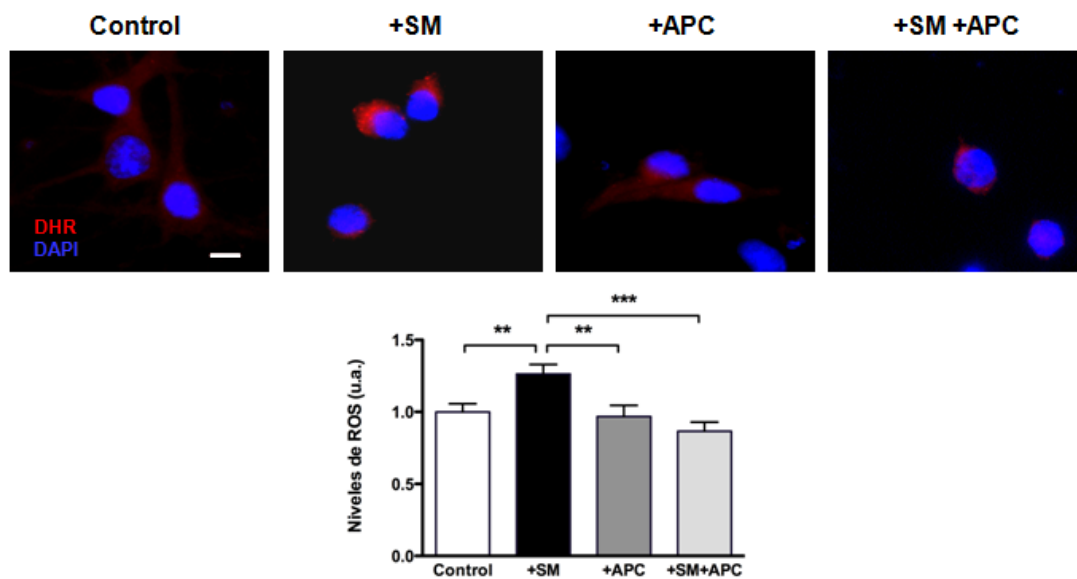


**Figura 4.9. Aumento de SM en la membrana plasmática de neuronas ASM-/- hipocámpales en cultivo.** Imágenes representativas de la señal de lisenina en neuronas hipocámpales de 12 DIV no permeabilizadas preparadas a partir de embriones ASM+/+ y ASM-/- . Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de esta señal por unidad de área.  $n = 3$  cultivos independientes,  $U$  de Mann-Whitney,  $P = 0.003$ .

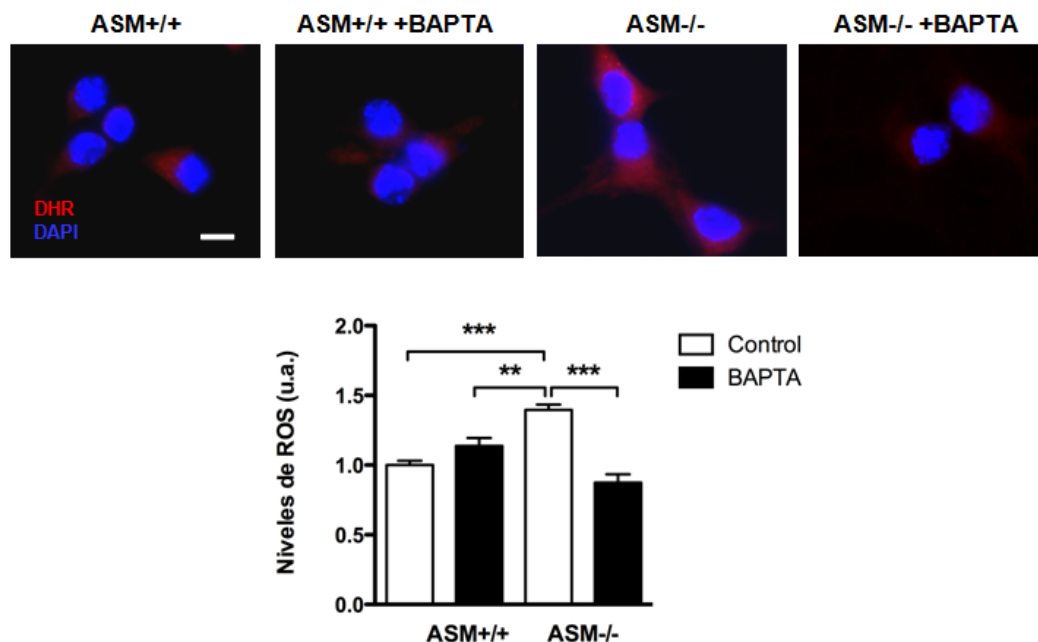
ROS mediante DHR. Este marcaje reveló que la adición del quelante en neuronas ASM-/- reducía la cantidad de ROS a niveles normales mientras que no producía cambios significativos en las neuronas ASM+/+ (Figura 4.12). Además, la incubación con BAPTA 30 minutos antes de la adición de SM en neuronas ASM+/+ impedía la aparición de ROS mediada por el lípido (Figura 4.13). Estos experimentos nos permitieron concluir que la acumulación de SM en neuronas ASM-/- induce la aparición de estrés oxidativo mediante un aumento del calcio intracelular.



**Figura 4.10. Presencia de estrés oxidativo en neuronas hipocámpales en cultivo de ratones ASM-/-.** Imágenes representativas de la señal fluorescente correspondiente a DHR (rojo), marcador de ROS, y DAPI (azul) en neuronas hipocámpales en cultivo preparadas a partir de embriones ASM+/+ y ASM-/-. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de DHR en los somas neuronales por unidad de área. n = 80 neuronas de 5 cultivos independientes, *U* de Mann-Whitney, *P* = 0.0004.

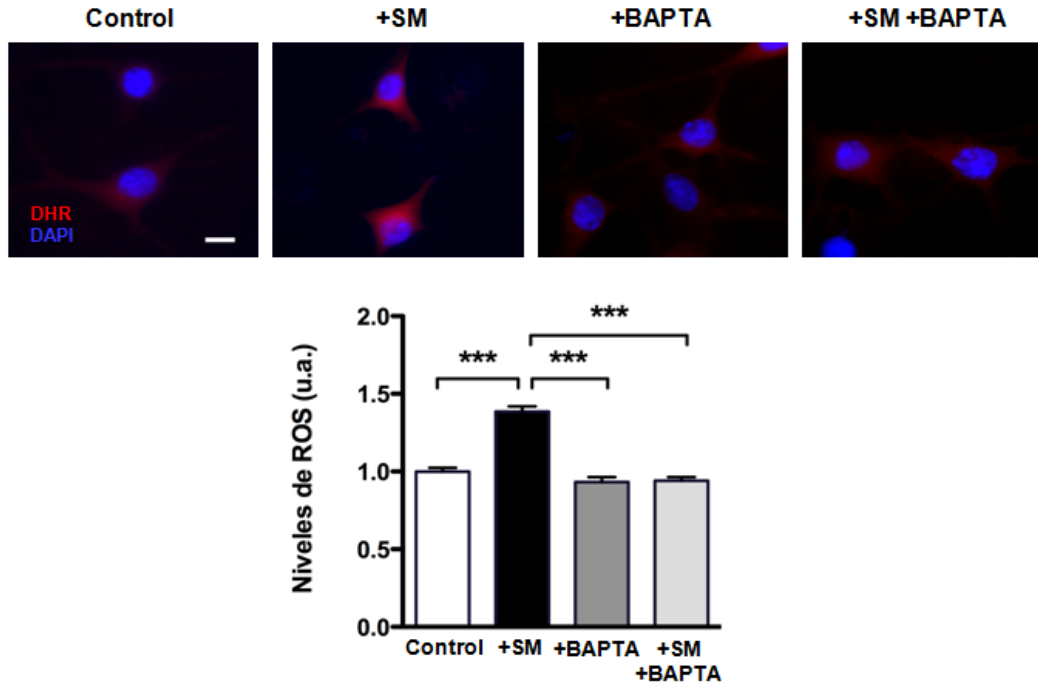


**Figura 4.11. La acumulación de SM causa estrés oxidativo.** Imágenes representativas de la señal fluorescente correspondiente a DHR (rojo), marcador de ROS, y DAPI (azul) en neuronas hipocámpales ASM-/- en cultivo en condiciones control, tratadas con SM, con el antioxidante apocinina (APC) o con ambos. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de DHR en los somas neuronales por unidad de área. n = 100 neuronas de 5 cultivos independientes, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima, *P*<sub>ctl/sm</sub> = 0.004; *P*<sub>sm/apc</sub> = 0.004; *P*<sub>sm/sm+apc</sub> = 0.0006.



**Figura 4.12. El estrés oxidativo en neuronas ASM-/ - es debido a una desregulación de calcio intracelular.** Imágenes representativas de la señal fluorescente correspondiente a DHR (rojo), marcador de ROS, y DAPI (azul) en neuronas hipocampales en cultivo ASM+/+ y ASM-/ - tratadas o no con BAPTA-AM 10  $\mu$ M a 12 DIV. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de DHR en los somas neuronales por unidad de área en los diferentes grupos. n = 80 neuronas de 3 cultivos independientes, U de Mann-Whitney seguido del *post hoc* de Bonferroni,  $P_{ASM+/+/ASM-/ -} = 0.0004$ ;  $P_{ASM+/+bapta/ASM-/ -} = 0.003$ ;  $P_{ASM-/ -/ASM-/ -bapta} = 0.00015$ .

A continuación decidimos analizar en detalle las alteraciones en la homeostasis de calcio que explicaran el estrés oxidativo observado en neuronas ASM-/ -. Para ello se midieron los niveles de calcio y su tamponamiento después de un estímulo en cultivos de neuronas hipocampales ASM+/+ y ASM-/ -. Las neuronas cultivadas sobre cubreobjetos se cargaron con Fura2-AM, un indicador ratiométrico de calcio, y se midió la fluorescencia en el soma neuronal usando una longitud de onda de excitación de 340 nm (excita Fura2 unido a calcio) y de 380 nm (para Fura2 libre) alternativamente, con filtro de emisión a 540 nm. Mediante el software Aquacosmos se obtuvo la relación de intensidad de fluorescencia 340/380 que se relaciona directamente con la concentración de calcio y permite su cuantificación. Las mediciones se hicieron en estado basal y después de un estímulo, como la adición de KCl 30 mM, que produce un incremento de calcio intracelular al despolarizar la membrana celular activando canales de voltaje sensibles a  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Courtney et al., 1990; Rose and Ransom, 1997). El aumento en los niveles de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  citosólicos activa los mecanismos de extrusión de estos iones: PMCA, SERCA y el intercambiador de  $Na^+/Ca^{2+}$  o NCX.

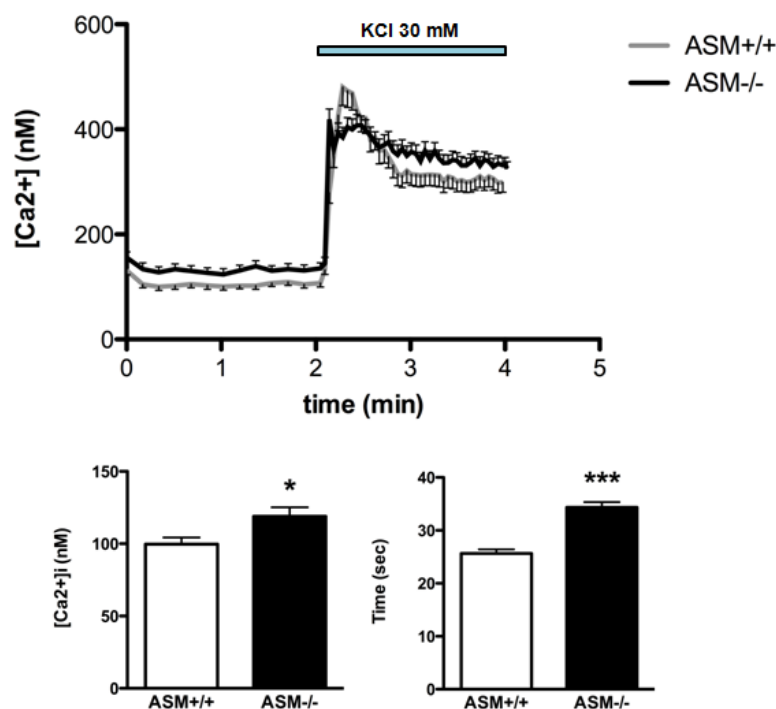


**Figura 4.13. La acumulación de SM incrementa el calcio intracelular que produce estrés oxidativo.** Imágenes representativas de la señal fluorescente correspondiente a DHR (rojo), marcador de ROS, y DAPI (azul) en neuronas hipocámpales ASM+/+ de 12 DIV en condiciones control, tratadas con SM, con BAPTA-AM o con ambos. Barra de escala = 10  $\mu$ m. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la señal de DHR en los somas neuronales por unidad de área en los diferentes grupos. n = 100 neuronas de 5 cultivos independientes, ANOVA de dos vías seguido del *post hoc* de Games-Howell,  $P_{ctl/sm} = 0.0003$ ;  $P_{sm/bapta} = 0.0002$ ;  $P_{sm/sm+bapta} = 0.00017$ .

El análisis de los niveles basales de calcio intracelular reveló un aumento en las neuronas ASM-/- comparadas con las ASM+/+. Además, aunque no se observaron diferencias en el incremento de los niveles de calcio inmediatamente después del estímulo, el tiempo requerido para reducir y estabilizar esos niveles fue significativamente mayor (40 %) en las neuronas ASM-/- (Figura 4.14).

Para comprobar si la acumulación de SM es la responsable de estas alteraciones se realizaron los mismos análisis en neuronas ASM+/+ tratadas o no con el lípido durante 16 h. La adición de SM aumentó los niveles basales de calcio intracelular y el tiempo necesario para estabilizar el calcio tras la estimulación con KCl en neuronas ASM+/+ de manera similar a lo observado en neuronas ASM-/- (Figura 4.15).

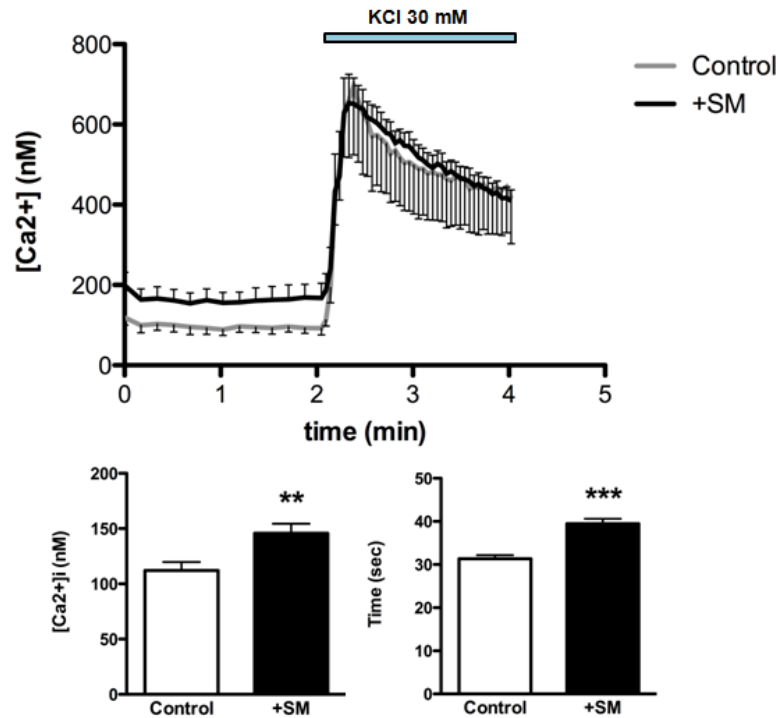
Estos resultados demuestran que el aumento de SM en las membranas de neuronas ASM-/- afecta a la homeostasis del calcio, aumentando sus niveles citosólicos basales y disminuyendo la capacidad de tamponamiento tras la estimulación.



**Figura 4.14. Aumento de los niveles de calcio basal y retraso en el tamponamiento después de un estímulo en neuronas ASM-/-.** Concentración de calcio intracelular (nM) con el tiempo (minutos) en neuronas hipocámpales ASM+/+ y ASM-/- de 12 DIV. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la concentración de calcio basal (izquierda), medida como promedio de los 2 primeros minutos de registro, y el tiempo que tardan las neuronas en llegar a la meseta de calcio tras el estímulo de KCl (derecha), en segundos. *U* de Mann-Whitney,  $P = 0.008$  para la concentración de calcio basal,  $P = 0.0005$  para el tiempo en llegar a la meseta de calcio.

#### 4.2.2. La deficiente actividad de la calcio-ATPasa de membrana (PMCA) es la responsable del aumento de calcio intracelular y el estrés oxidativo en las neuronas ASM-/-.

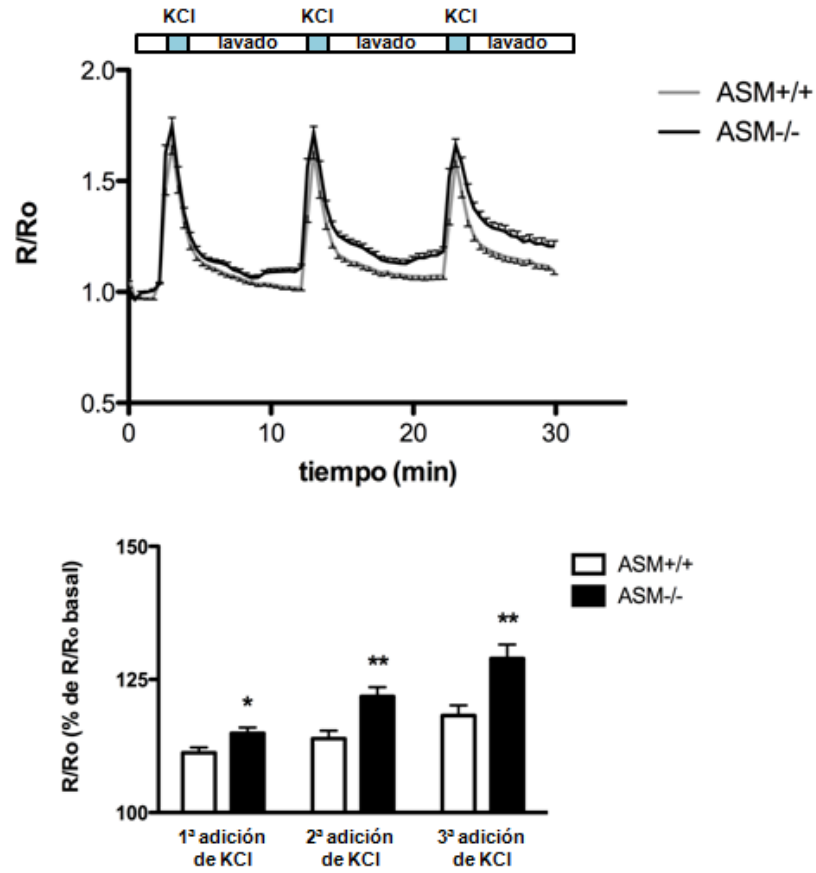
Entre los sistemas que se encargan de la extrusión de calcio en neuronas decidimos analizar los que se encuentran en la membrana plasmática, PMCA y NCX (Guerini et al., 1998) (Strehler et al., 2007) por varias razones. Estas proteínas son las principales responsables del mantenimiento de los niveles de calcio basal y tras un estímulo (Berridge et al., 2003). Además el aumento de la SM, que provoca la desregulación del calcio, es evidente en la membrana plasmática de las neuronas ASM-/- (Galvan et al., 2008). Para hacer estos análisis decidimos cambiar el paradigma experimental de un solo estímulo a otro más parecido a las condiciones fisiológicas en el que utilizamos una secuencia de estímulos. Los niveles de calcio se midieron con Fura2-AM en neuronas sometidas a perfusión continua, que permitía eliminar el KCl del medio después de 1 minuto de incubación. De esta manera las neuronas deberían



**Figura 4.15.** El incremento de SM es responsable del aumento de los niveles de calcio basal y del retraso en el tamponamiento después de un estímulo en neuronas ASM-/- . Concentración de calcio intracelular (nM) con el tiempo (minutos) en neuronas hipocampales de 12 DIV tratadas o no con SM durante 16 h. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la concentración de calcio basal (izquierda), medida como promedio de los 2 primeros minutos de registro, y el tiempo que tardan las neuronas en llegar a la meseta de calcio tras el estímulo de KCl (derecha), en segundos. *U* de mann-Whitney,  $P = 0.003$  para la concentración de calcio basal,  $P = 0.0001$  para el tiempo en llegar a meseta de calcio.

ser capaces de recuperar los niveles de calcio iniciales tras cada estímulo. En total realizamos tres adiciones de KCl de 1 min durante 30 minutos de registro. Mientras que las neuronas ASM+/+ recuperaban los niveles iniciales de calcio tras cada estímulo, las neuronas ASM-/- no llegaban a alcanzar los niveles basales (Figura 4.16).

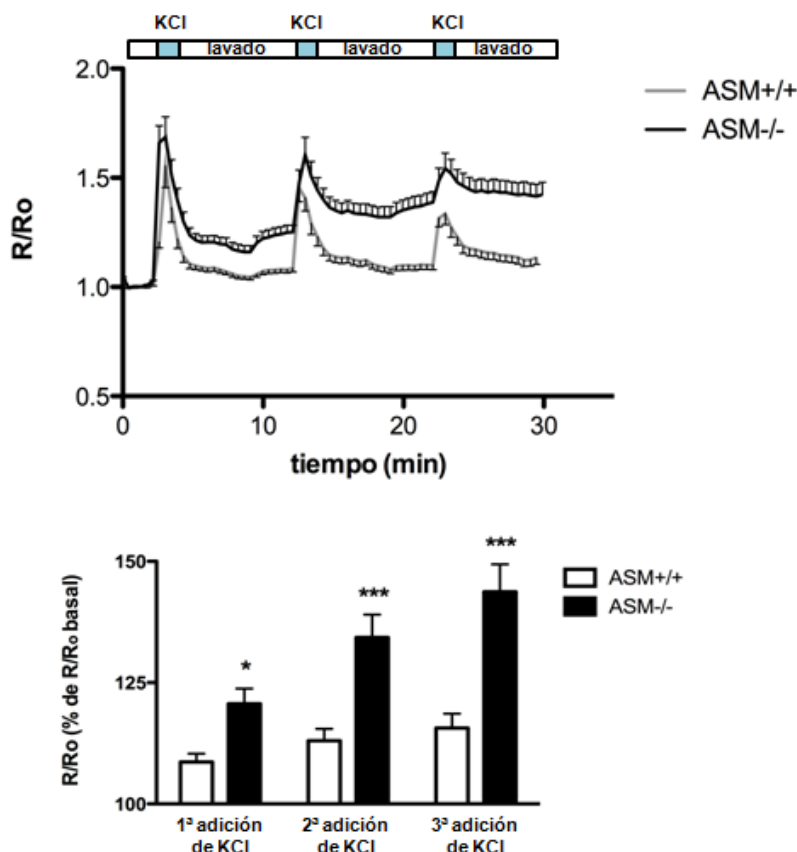
Para estudiar la posible contribución a este problema de tamponamiento del intercambiador NCX, cuya actividad depende de  $Na^+$ , se realizó el mismo experimento pero en ausencia de este catión que se sustituyó por colina para mantener la osmolaridad de la solución. En este caso se observó que las neuronas ASM+/+ eran capaces de compensar la pérdida de función de NCX con otros sistemas de extrusión de calcio, recuperando los niveles iniciales tras cada estímulo, aunque con una evidente reducción del pico de calcio en las sucesivas adiciones de KCl (Figura 4.17). Sin embargo, en estas condiciones en las que se había anulado la participación de NCX, la diferencia en el tamponamiento entre neuronas ASM+/+ y ASM-/- no sólo se mantenía si no que se intensificaba (Figura 4.17). Estos resultados descar-



**Figura 4.16. Defectos en el tamponamiento de calcio después de un estímulo en neuronas ASM-/- en condiciones de estimulación secuencial.** Relación de la señal de fluorescencia de Fura2-AM, F340/380 (R), respecto a esta relación inicial ( $R_0$ ),  $R/R_0$ , a lo largo del tiempo (minutos) en neuronas hipocámpales ASM+/+ y ASM-/- de 12 DIV. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la relación  $R/R_0$  tras cada estímulo con KCl en porcentaje respecto a  $R/R_0$  basal.  $n = 50$  neuronas de 3 cultivos independientes,  $U$  de mann-Whitney,  $P_{KCl1} = 0.014$ ,  $P_{KCl2} = 0.001$ ,  $P_{KCl3} = 0.003$ .

tan una contribución relevante de NCX a la desregulación de calcio en las neuronas ASM-/- sugiriendo que otro mecanismo de extrusión de calcio está implicado en esta alteración.

Nos centramos por tanto en analizar la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana PMCA. Para medir directamente la actividad de esta ATPasa se utilizó un sistema de reacciones acopladas que se desencadenan con la adición de ATP y permite medir la actividad de todas las ATPasas de  $Ca^{2+}$  y de  $Mg^{2+}$ . Con el uso de diferentes inhibidores cuantificamos la actividad de PMCA, SERCA y ATPasa de la vía secretora (SPCA). La concentración de calcio en el medio de reacción puede influir en la actividad de estas ATPasas. Así, según se describe en varios trabajos en cerebro humano (Berrocal et al., 2009) y de cerdo (Palacios et al., 2003; Salvador et al., 1998) el pCa (logaritmo negativo de la concentración de calcio) óptimo es 5.5 ( $[Ca^{2+}] = 3.16$



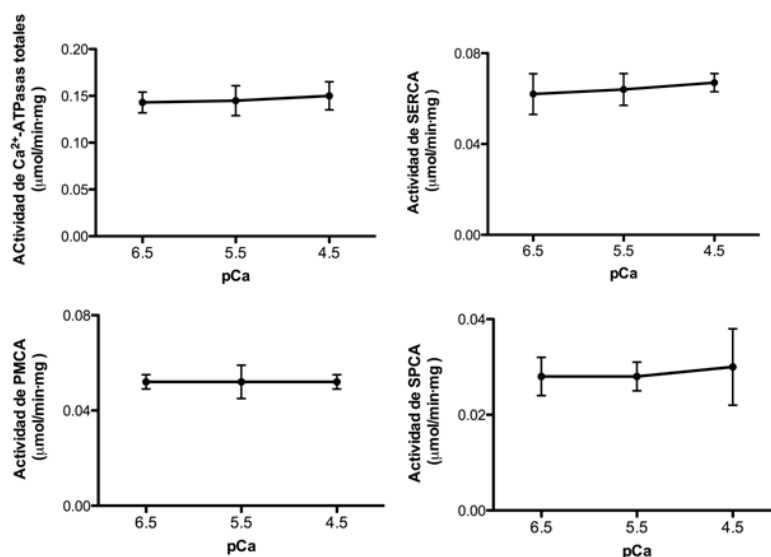
**Figura 4.17. NCX no contribuye significativamente a las alteraciones en los niveles de calcio en neuronas ASM-/-.** Relación de la señal de fluorescencia de Fura2-AM, F340/380 (R) respecto a esta relación inicial ( $R_0$ ),  $R/R_0$ , a lo largo del tiempo (minutos) en neuronas hipocámpales ASM+/+ y ASM-/- de 12 DIV. El  $\text{Na}^+$  del medio se ha sustituido por colina, de manera que NCX no es capaz de funcionar. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de la relación  $R/R_0$  tras cada estímulo con KCl en porcentaje respecto a  $R/R_0$  basal.  $n = 50$  neuronas de 3 cultivos independientes,  $U$  de mann-Whitney,  $P_{KCl1} = 0.009$ ,  $P_{KCl2} = 0.0002$ ,  $P_{KCl3} = 0.00003$ .

$\mu\text{M}$ ). Por tanto, en primer lugar determinamos la actividad óptima de estas enzimas en nuestro sistema experimental usando un rango de concentración de calcio que comprendiera este valor: de 0.316 a 31.62  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, en nuestras muestras de hipocampo de ratón no se observaron diferencias en la actividad de estas enzimas en los diferentes pCa analizados (6.5, 5.5 y 4.5) (Figura 4.18) por lo que decidimos realizar los experimentos a un valor de pCa de 5.5.

La medida de actividad enzimática a esta concentración de calcio reveló una disminución significativa (28 %) en la actividad total de las  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, debida a una reducción en la actividad de PMCA sin cambios significativos en SERCA o SPCA (Figura 4.19).

Todos estos resultados indican que las alteraciones de calcio en neuronas ASM-/- se deben a una pérdida de actividad de la PMCA, descartando posibles contribucio-





**Figura 4.18. Actividad de las diferentes ATPasas a distintos pCas.** Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la actividad de las ATPasas medida en extractos de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ a distintos pCas: 6.5 ( $[Ca^{2+}] = 0.316 \mu M$ ), 5.5 ( $[Ca^{2+}] = 3.16 \mu M$ ) y 4.5 ( $[Ca^{2+}] = 31.62 \mu M$ ). n = 6.

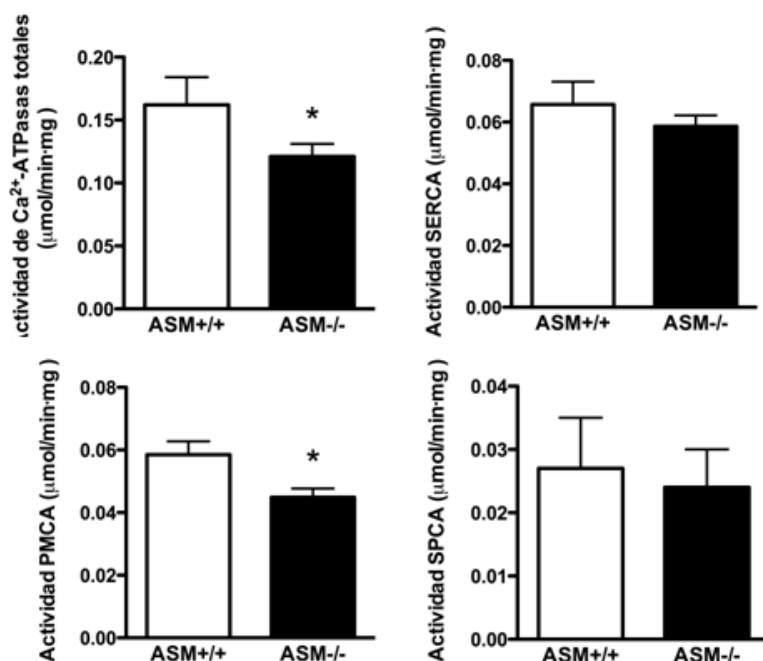
nes de otros sistemas reguladores de la homeostasis de calcio como NCX, SERCA o SPCA.

#### 4.2.3. 2.3. La pérdida de actividad de PMCA en neuronas ASM-/- se debe al aumento de SM en la membrana plasmática

A continuación nos propusimos determinar el mecanismo por el que la actividad de PMCA está reducida en neuronas ASM-/-.

En primer lugar determinamos sus niveles por western blot usando un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de la proteína (5F10) en extractos totales o de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/-. No encontramos diferencias significativas (Figura 4.20).

Trabajos previos habían indicado la influencia de la composición lipídica de la membrana plasmática en la actividad de PMCA. Así, experimentos llevados a cabo en liposomas demostraron que un aumento en la proporción SM/colesterol disminuye la actividad de esta bomba de calcio (Pang et al., 2005). Su actividad también se ve afectada por cambios en las concentraciones de fosfatidilinositolfosfato PIP2 (Choquette et al., 1984; Carafoli and Zurini, 1982), de fosfatidilserina (Niggli et al., 1981) y de diferentes gangliósidos (Zhao et al., 2004). Por otra parte, la actividad de PMCA es mayor cuando ésta se localiza en los rafts lipídicos de la membrana (Jiang et al., 2012).

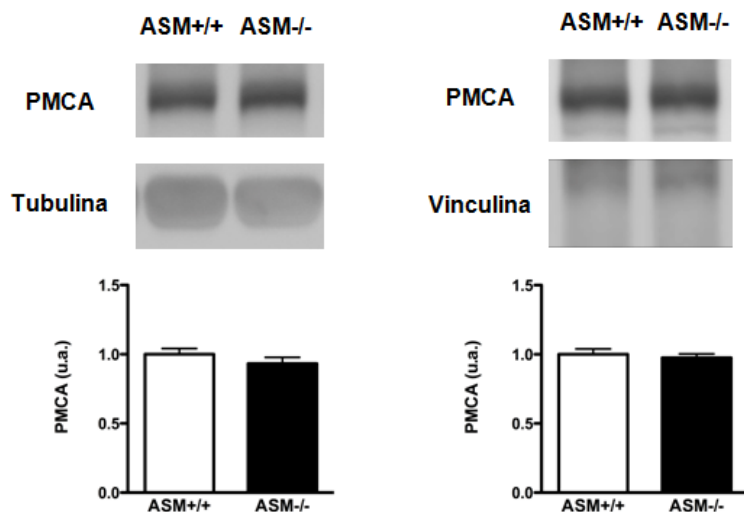


**Figura 4.19. La actividad de PMCA está disminuida en el hipocampo de ratones ASM-/-, sin cambios en otras ATPasas como SERCA y SPCA.** Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la actividad de las diferentes ATPasas (Ca<sup>2+</sup>-ATPasas totales, SPCA, PMCA y SERCA) en extractos de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/-.  $n = 8$ ,  $t$  de Student,  $P_{total} = 0.012$ ,  $P_{SERCA} = 0.189$ ,  $P_{PMCA} = 0.015$ ,  $P_{SPCA} = 0.789$ .

Por ello postulamos que el ambiente lipídico alterado de la membrana de neuronas ASM-/-(Galvan et al., 2008) podría estar causando la pérdida de actividad de PMCA. Para comprobar esta hipótesis se realizó el ensayo de actividad enzimática en extractos de hipocampo en presencia de saponina, un detergente que permite disgregar la membrana plasmática y aislar así a la proteína PMCA de su ambiente lipídico. En este caso no se observaron las diferencias de actividad entre los extractos de ratones ASM+/+ y ASM-/-. Además el tratamiento de la muestra con saponina no produjo cambios en otras ATPasas como SERCA o SPCA (Figura 4.21). Estos resultados indicaron que el ambiente lipídico alterado en el cerebro de ratones ASM-/-(afecta específicamente a la actividad de PMCA.

A continuación quisimos estudiar si la alteración lipídica más relevante en las membranas de neuronas ASM-/-(el incremento de SM, era directamente responsable de la deficiente actividad de PMCA. Para ello se midió la actividad enzimática en neuronas ASM+/+ en cultivo incubadas con el lípido durante 16 horas. En este caso se observó la disminución específica de la actividad de PMCA (26 %) sin cambios en el resto de Ca<sup>2+</sup>-ATPasas analizadas (Figura 4.22).

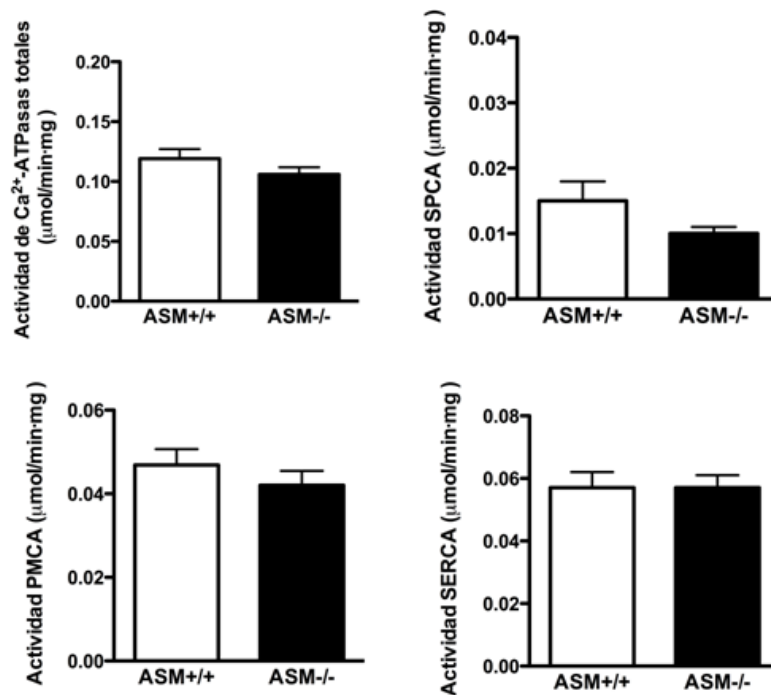
Por último, se decidió estudiar si la presencia de PMCA en rafts de membrana, que favorece su actividad, estaba alterada. Para ello se usaron muestras de extractos



**Figura 4.20. La reducción de actividad de PMCA en los ratones ASM-/- no se debe a cambios en los niveles de proteína.** Western blot con un anticuerpo contra PMCA en extractos totales (izquierda) y en purificaciones de membrana (derecha) de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- de 4 meses de edad. Como control de carga se usó tubulina, en el caso de extractos totales, y vinculina para las fracciones de membrana. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de proteína.  $n = 7$ ,  $t$  de Student,  $P_{total} = 0.218$ ,  $P_{membrana} = 0.618$ .

de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- que se trataron con detergente Tritón X-114 en frío y se cargaron en un gradiente de sacarosa (80, 35 y 5%). Tras la centrifugación se obtuvieron fracciones de diferente densidad que se analizaron por western blot. Como control de la correcta purificación de rafts se usó un anticuerpo contra flotilina, una proteína especialmente enriquecida en los rafts lipídicos (Bickel et al., 1997). Como resultado se observó una disminución de la presencia de PMCA en las fracciones de rafts en extractos de hipocampo de ratones ASM-/- . En concreto, la cantidad de PMCA bajaba en la fracción 3 correspondiente a proteínas insolubles a detergentes que se incorporan a rafts mientras que aumentaba en la fracción 11 de proteínas solubles (Figura 4.23). El análisis de la distribución de flotilina no reveló cambios aparentes en esta proteína confirmando el correcto aislamiento de rafts e indicando que el efecto es específico de PMCA.

En conjunto, estos resultados indican que la composición lipídica alterada de las membranas ASM-/- afecta a la actividad de PMCA. En concreto, la acumulación de SM reduce la actividad de la proteína que además se desplaza de los rafts de membrana.

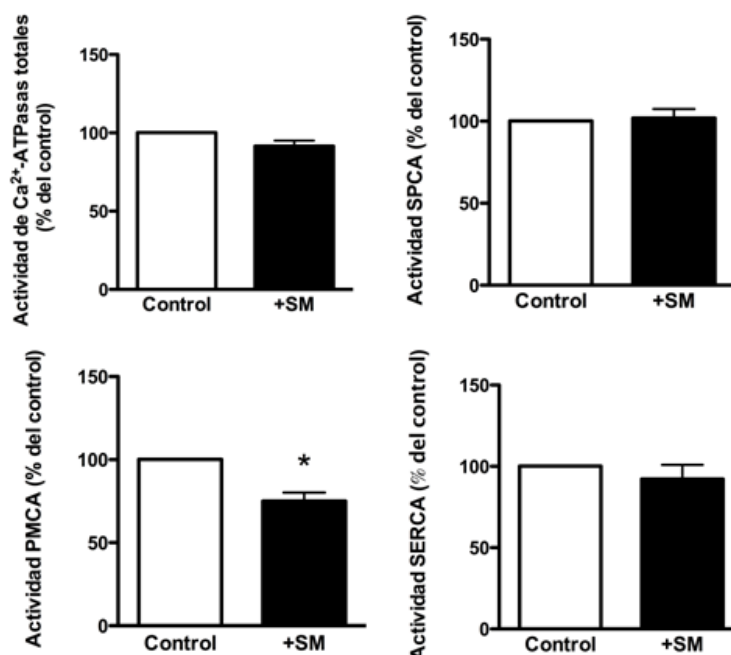


**Figura 4.21.** La disminución de actividad de PMCA en el hipocampo de ratones ASM-/- no se observa cuando se elimina la influencia del entorno lipídico en la membrana. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la actividad de las diferentes ATPasas (Ca<sup>2+</sup>-ATPasas totales, SPCA, PMCA y SERCA) en extractos de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- en presencia de saponina 0.1 % que permite aislar a las ATPasas del entorno lipídico de la membrana. n = 8, t de Student,  $P_{total}$  = 0.208,  $P_{SPCA}$  = 0.256. Para PMCA y SERCA: U de Mann-Whitney,  $P_{SERCA}$  = 0.636,  $P_{PMCA}$  = 0.525.

### 4.3. Prevención del estrés oxidativo y la muerte neuronal mediante el uso de un inhibidor de las deacetilasas de histonas (HDACi)

#### 4.3.1. El ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA o vorinostat) aumenta los niveles de PMCA y protege frente al estrés oxidativo mediado por el aumento de SM en neuronas en cultivo

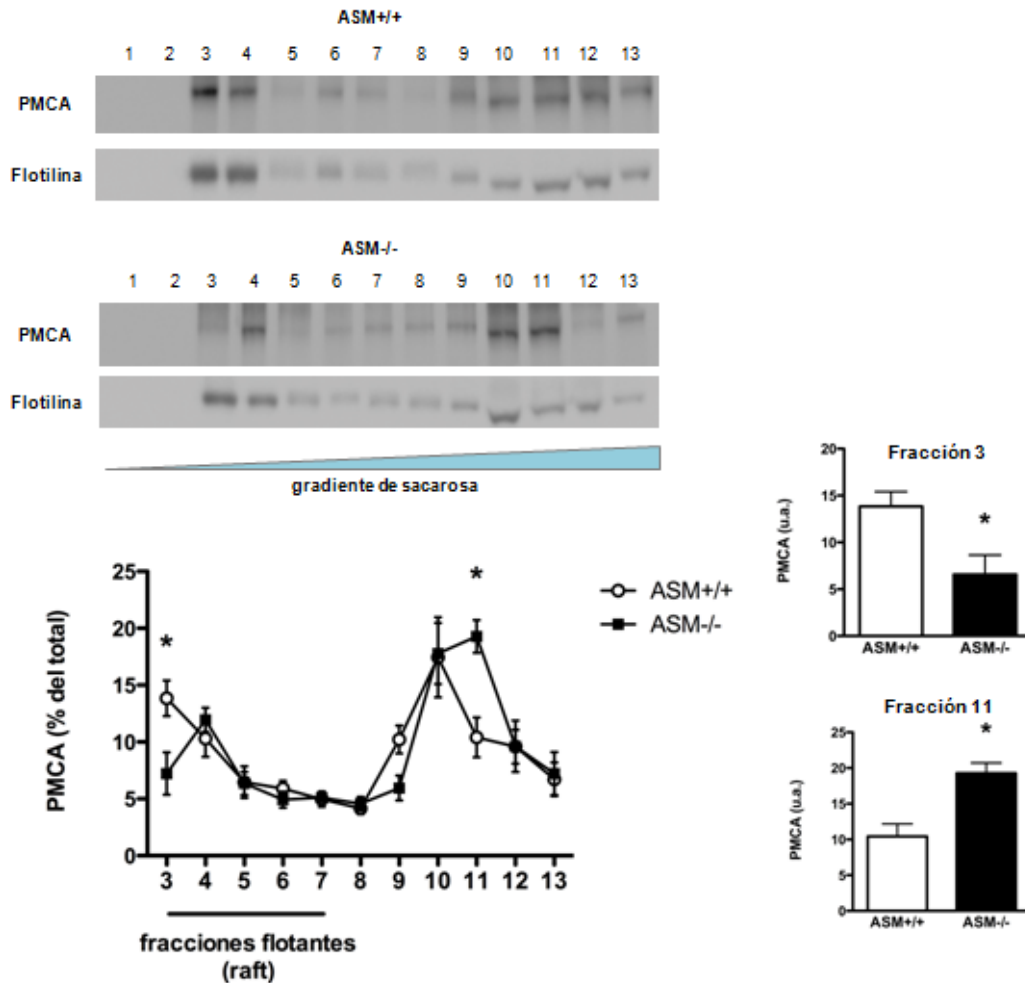
Una vez descrita la causa del estrés oxidativo y las alteraciones en los niveles de calcio en neuronas ASM-/- nos propusimos buscar una estrategia para evitar este fenotipo aberrante tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio publicado recientemente se habían usado diferentes compuestos (resumidos en la tabla I) para incrementar los niveles de una de las isoformas de PMCA, PMCA4b, en una línea



**Figura 4.22. La acumulación de SM en la membrana plasmática reduce la actividad de PMCA en neuronas.** Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de la actividad de las diferentes ATPasas ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas totales, SPCA, PMCA y SERCA) en neuronas hipocámpales ASM+/+ de 12 DIV tras la adición de SM durante 16 h.  $n = 6$ ,  $t$  de Student,  $P_{total} = 0.058$ ,  $P_{SPCA} = 0.735$ ,  $P_{SERCA} = 0.189$ ,  $P_{PMCA} = 0.017$ .

celular de cáncer de mama (Varga et al., 2014). Además la proteína se localiza en la membrana plasmática, el compartimento donde ejerce su función, lo que conlleva un aumento en la tasa de extrusión de calcio de estas células. Entre los compuestos que se usaron en este trabajo se encuentra el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), un activador de la proteína quinasa C (PKC), que activa PMCA mediante fosforilación (Neyses et al., 1985) y que induce su expresión (Kuo et al., 1991). También se usaron diferentes HDACis, que actúan impidiendo la correcta función de las deacetilasas de histonas y promoviendo por tanto la acetilación de histonas. De esta manera la cromatina es menos compacta y transcripcionalmente más activa. Entre los HDACis que se describen nos centramos en dos, SAHA y valproato, ya que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Hockly et al., 2003; Cornford et al., 1985), de manera que tienen potencial para producir un efecto en cerebro cuando se administran periféricamente. Además no sólo aumentan los niveles de PMCA4b sino también de otra de las isoformas: PMCA1 y han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de diferentes enfermedades como el linfoma cutáneo de células T en el caso de SAHA (Bhatt et al., 2013) o la epilepsia y trastorno bipolar en el caso del valproato (Perucca, 2002).

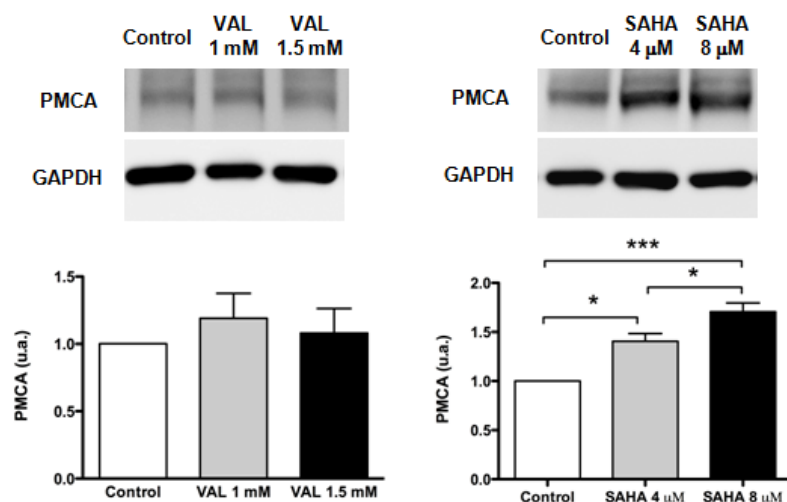
En primer lugar analizamos el efecto de estos dos compuestos en neuronas hi-



**Figura 4.23. La presencia de PMCA en rafts lipídicos está disminuida en cerebros de ratones ASM-/-.** Western blot contra PMCA en las diferentes fracciones resultantes del aislamiento de rafts lipídicos de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- a partir de un gradiente de sacarosa. Como control de la correcta purificación se usó un anticuerpo contra flotilina. La gráfica en el centro representa la media  $\pm$  SEM de los niveles de PMCA, en porcentaje respecto al total, en las diferentes fracciones de rafts. Las gráficas de barras representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de PMCA en la fracción 3 (arriba) y la 11 (abajo).  $n = 5$ ,  $t$  de Student,  $P_{\text{fracción 3}} = 0.023$ ,  $P_{\text{fracción 11}} = 0.014$ .

pocampales en cultivo. Las células se trataron durante cuatro días con dos dosis diferentes de cada compuesto (1 y 1.5  $\mu\text{M}$  en el caso de valproato y 4 y 8  $\mu\text{M}$  en el caso de SAHA). Tras los tratamientos se analizaron por western blot los niveles de PMCA, usando el anticuerpo que reconoce todas las isoformas de la proteína. Mientras que el valproato no tenía efecto sobre los niveles de PMCA, el tratamiento con SAHA consiguió un aumento significativo que fue mayor con la dosis más alta (Figura 4.24).

Los resultados positivos con SAHA nos animaron a estudiar el efecto de este



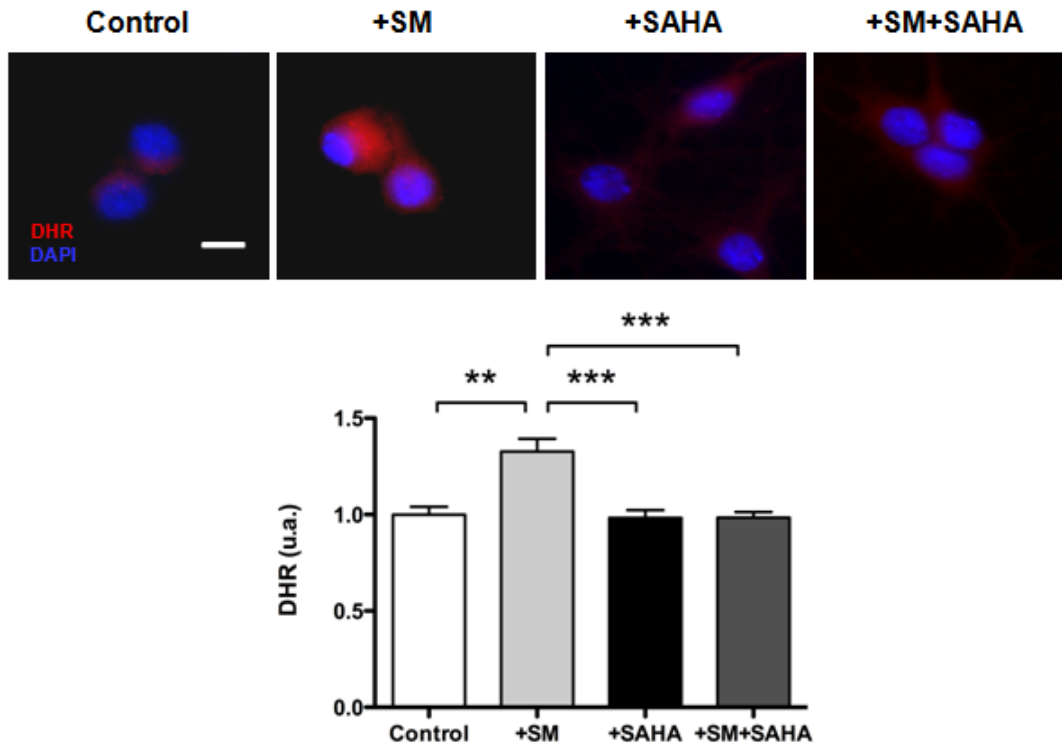
**Figura 4.24. El HDACi SAHA aumenta los niveles de PMCA en neuronas en cultivo.** Western blot contra PMCA en neuronas ASM+/+ tratadas durante 4 días con valproato (VAL, izquierda) o SAHA (derecha) a dos dosis diferentes. Como control de carga se usó un anticuerpo contra GAPDH. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de PMCA.  $n = 3$  cultivos independientes, ANOVA de una vía seguida del *post hoc* de Games-Howell,  $P_{ctl/vpa1} = 0.669$ ,  $P_{ctl/vpa1,5} = 0.927$ ,  $P_{vpa1/vpa1,5} = 0.869$ ,  $P_{ctl/saha4} = 0.006$ ,  $P_{ctl/saha8} = 0.0005$ ,  $P_{saha4/saha8} = 0.0025$ .

compuesto sobre el estrés oxidativo inducido por SM en neuronas en cultivo. Para ello se trataron neuronas ASM+/+ con la dosis en la que SAHA aumentaba más eficazmente los niveles de PMCA ( $8 \mu\text{M}$ ) durante cuatro días antes de la adición de SM. Tras la incubación con SM se midieron los niveles de ROS usando DHR. Mientras que SAHA por sí solo no produjo cambios significativos en los niveles basales de ROS el pre tratamiento con este compuesto impidió el aumento de ROS mediado por SM (Figura 4.25).

Estos resultados demuestran que SAHA aumenta la expresión de PMCA y evita el estrés oxidativo mediado por SM en neuronas en cultivo.

#### 4.3.2. El tratamiento oral con SAHA induce la expresión de PMCA en el cerebro de ratones ASM-/-

Una vez comprobado que SAHA tenía efectos positivos en neuronas en cultivo decidimos probarlo en los ratones ASM-/-. Varios tratamientos con SAHA se habían ensayado *in vivo* administrando el compuesto por diferentes vías: inyección intraventricular (Peleg et al., 2010), intraperitoneal (Guan et al., 2009; Hanson et al., 2013), subcutánea (Hockly et al., 2003; Riessland et al., 2010) o en el agua de bebida acompañado con ciclodextrina (Hockly et al., 2003; Riessland et al. 2010). Puesto que mediante todas estas vías SAHA tiene efecto a nivel cerebral se eligió ésta última por ser la menos invasiva. Se acompañó el compuesto con hidroxipropil-ciclodextrina

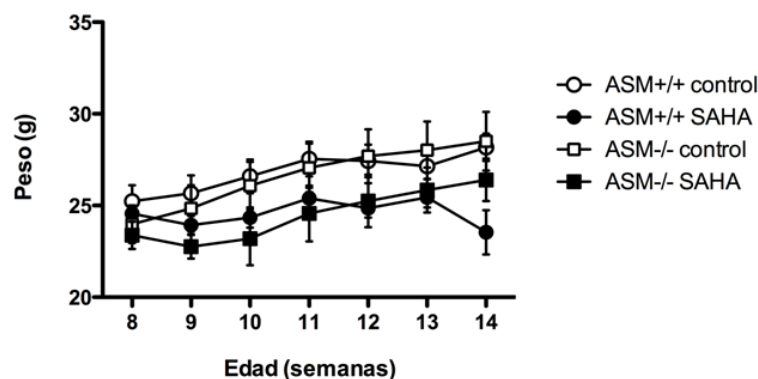


**Figura 4.25. El HDACi SAHA protege frente al estrés oxidativo generado por el aumento de SM en neuronas en cultivo.** Imágenes representativas del marcaje con DHR (rojo) y DAPI (azul) en neuronas ASM+/+ hipocámpales en condiciones control, tratadas con SM, tratadas con SAHA 8  $\mu$ M durante 4 días o tratadas con SAHA 8  $\mu$ M 4 días antes de la adición de SM durante 16 h. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de los niveles de ROS en los diferentes grupos. n = 50 neuronas de 3 cultivos independientes, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de Games-Howell,  $P_{ctl/sm} = 0.001$ ,  $P_{sm/saha} = 0.0003$ ,  $P_{sm/sm+saha} = 0.0003$ .

(HOP-CD) de modo que se solubilizara en el agua (ver métodos). Se eligió una dosis que, según se ha descrito en otros modelos de ratón, no produce toxicidad evidente: 100 mg/kg por día (Hockly et al., 2003). El tratamiento se inició a los dos meses de edad y se prolongó durante seis semanas. Los ratones control recibieron la misma cantidad de HOP-CD. A lo largo del tratamiento se controló el peso de los ratones. Aunque, tal y como se había descrito (Hockly et al., 2003), la administración de SAHA disminuyó ligeramente el aumento de peso en todos los ratones tratados, no se observaron diferencias en el peso de los ratones ASM-/- respecto a los ASM+/+ (Figura 4.26).

Para determinar si los tratamientos con SAHA tenían efecto a nivel de cerebro se analizó la acetilación de una de las histonas, la histona 3, por western blot en extractos de hipocampo de los ratones control y tratados, con un anticuerpo que reconoce la lisina 18 acetilada (H3K18). Tanto en los ratones ASM+/+ como en los ASM-/- el tratamiento aumentó significativamente esta acetilación sin observarse





**Figura 4.26. Evolución del peso corporal de los ratones control y tratados con SAHA a lo largo del tiempo.** La gráfica representa la media  $\pm$  SEM del peso corporal de los animales de los diferentes grupos.

cambios en los niveles totales de histona 3 (Figura 4.27).

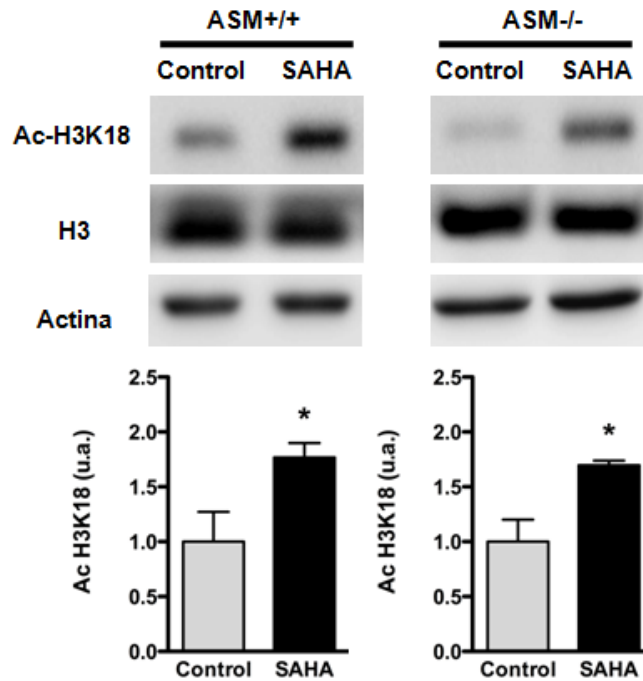
Para determinar si el tratamiento con SAHA afectaba la composición lipídica en cerebro analizamos la cantidad de SM, incrementada en los ratones ASM-/-, y la de colesterol, ya que la HOP- $\beta$ -CD libre podría disminuir los niveles de este lípido (Kilsdonk et al., 1995). Los ensayos enzimáticos en extractos de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- tratados o no con SAHA revelaron que los elevados niveles de SM en los ratones ASM-/- no disminuyen con el tratamiento y que la cantidad de colesterol tampoco sufre variación significativa en ningún caso (Figura 4.28).

A continuación nos propusimos comprobar si el cambio en la acetilación de histonas en el hipocampo mediado por el tratamiento con SAHA conllevaba un aumento de la expresión de PMCA. Para ello se analizaron los niveles de esta proteína por western blot en extractos de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- tratados o no. El tratamiento con SAHA provocaba un aumento similar de PMCA (20 %) en los ratones ASM+/+ y ASM-/- tratados (Figura 4.29).

En conjunto estos resultados indicaron que el tratamiento oral con SAHA provoca efectos en la acetilación de histonas en cerebro y aumenta la expresión de PMCA sin alterar la cantidad de SM o colesterol.

### 4.3.3. El tratamiento oral con SAHA previene el estrés oxidativo y la muerte neuronal en ratones ASM-/-

El aumento inducido por SAHA de los niveles de PMCA en hipocampo, cuya deficiencia es responsable de la alteración del calcio y estrés oxidativo en ratones ASM-/-, nos llevó a determinar si este tratamiento también disminuía los niveles de ROS. La tinción con DHR reveló que estos niveles se reducían un 70 % en los

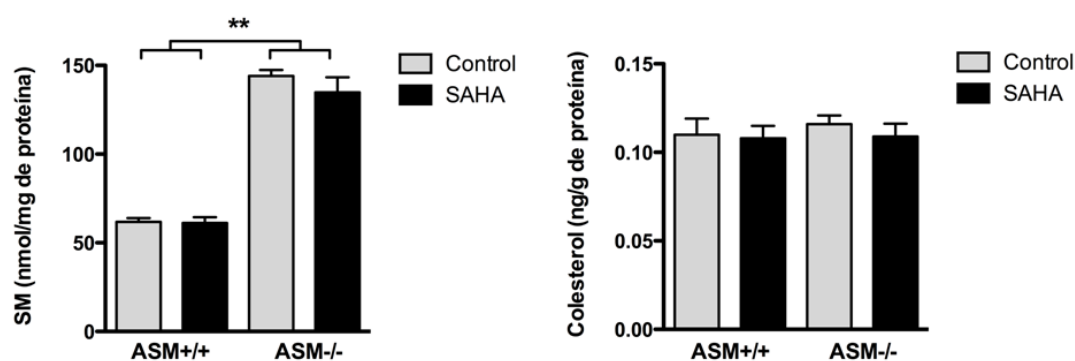


**Figura 4.27. El tratamiento con SAHA aumenta la acetilación de histonas en el hipocampo.** Western blot detectando la histona 3 total y acetilada en la lisina 18 en extractos de hipocampo de ratones ASM+/+ (izquierda) y ASM-/- (derecha) control y tratados con SAHA. Como control de carga se usó un anticuerpo que reconoce actina. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de los niveles de histona 3 acetilada respecto a los de actina.  $n = 7$ ,  $t$  de Student,  $P_{ASM+/+} = 0.023$ ,  $P_{ASM-/-} = 0.019$ .

ratones ASM-/- tratados con SAHA sin que se detectaran cambios significativos en los ratones ASM+/+ (Figura 4.30).

El estrés oxidativo generado por un aumento en el calcio intracelular puede provocar muerte neuronal (Gleichmann and Mattson, 2011). Para determinar si este era el caso en neuronas ASM-/- analizamos la neurodegeneración en ratones ASM-/- tratados o no con SAHA. En el estadio en el que realizamos nuestros estudios la muerte neuronal no es aún evidente en el hipocampo pero si en las células de Purkinje del cerebelo (Sarna et al., 2001). Por ello decidimos centrarnos en el análisis de esta área cerebral. En primer lugar comprobamos que los niveles de PMCA aumentaban en extractos de membrana de cerebelo de ratones ASM+/+ como ASM-/- tratados con SAHA de manera similar a lo observado en el hipocampo (Figura 4.31). Para analizar la neurodegeneración se realizaron inmunotinciones en secciones de cerebelo fijadas utilizando un anticuerpo contra la calbindina, proteína cuya expresión es específica de las células de Purkinje. La cuantificación del número de neuronas positivas para calbindina por unidad de área reveló un aumento del 50 % en ratones ASM-/- tratados con SAHA respecto a los ratones sin tratar (Figura 4.32).

Todos estos datos confirman que el tratamiento oral con SAHA, que es capaz de



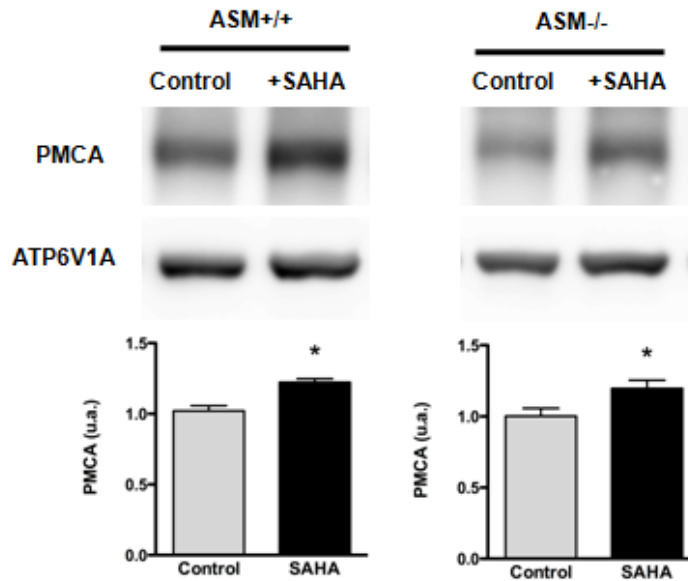
**Figura 4.28. El tratamiento con SAHA no produce cambios en los niveles de SM o colesterol en el hipocampo.** Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de SM (izquierda) y colesterol (derecha) en extractos de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- control y tratados con SAHA.  $n = 7$ . Para la medida de SM: ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de Games-howell,  $P_{ASM+/+/ASM+/+saha} = 0.998$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.754$ ,  $P_{ASM+/+/ASM-/-} = 0.0012$ ,  $P_{ASM+/+/ASM-/-saha} = 0.001$ . Para la medida de colesterol: ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima,  $P_{ASM+/+/ASM+/+saha} = 0.834$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.885$ ,  $P_{ASM+/+/ASM-/-} = 0.913$ ,  $P_{ASM+/+/ASM-/-saha} = 0.961$ .

aumentar los niveles de proteína PMCA en hipocampo y cerebelo, previene el estrés oxidativo y la muerte neuronal en los ratones ASM-/-.

#### 4.3.4. El tratamiento oral con SAHA previene los déficits de memoria espacial y motores en los ratones ASM-/-

Los pacientes de NPA sufren severos déficits cognitivos y motores (Crocker and Farber, 1958; Forsythe et al., 1959). Estas alteraciones también se dan en los ratones ASM-/-(Horinouchi et al., 1995; Otterbach y Stoffel, 1995; Arroyo et al., 2014). El aumento de la concentración de calcio intraneuronal que conduce al estrés oxidativo en el hipocampo y a la neurodegeneración en el cerebelo puede contribuir de manera determinante a estas deficiencias de comportamiento. Por tanto, quisimos comprobar si al disminuir el estrés oxidativo el tratamiento con SAHA era capaz de prevenirlas. Para ello analizamos el comportamiento de los ratones tratados o no con SAHA en una prueba de memoria dependiente de hipocampo (la prueba de la Y) así como en una prueba de coordinación motora (rotarod).

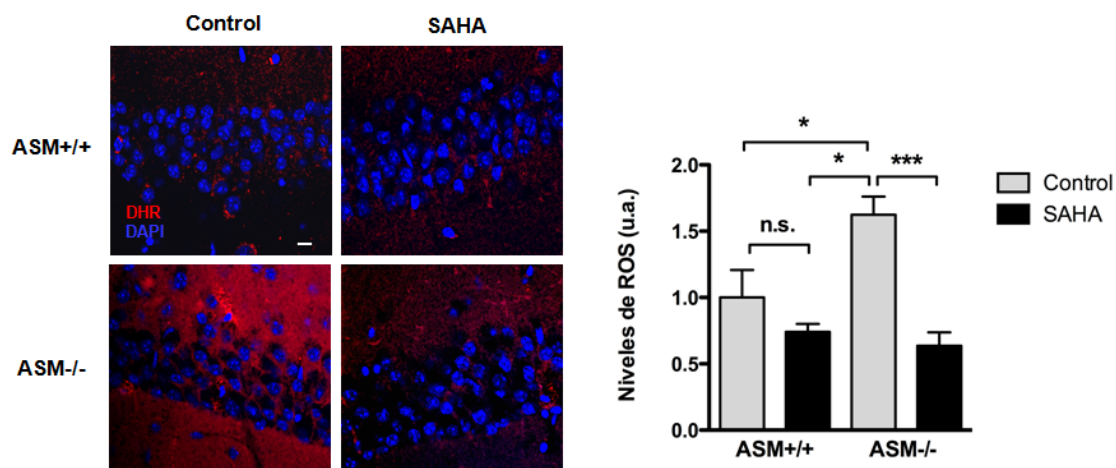
La prueba de la Y es un test de memoria espacial dependiente de hipocampo (Deacon et al., 2002; O'Keefe y Nadel L, 1978) en la que los ratones ASM-/-(Arroyo et al., 2014). Este test se basa en la tendencia de los ratones a explorar nuevos ambientes. Consiste en colocar al animal en un laberinto en forma de Y y dejarlo explorar libremente dos de los brazos, con el tercero cerrado, durante unos minutos. Una hora después se realiza la prueba, en la que el animal se



**Figura 4.29. El tratamiento con SAHA aumenta los niveles de PMCA en extractos de membrana de hipocampo.** Western blot de extractos de membrana de hipocampo de ratones ASM+/+ (izquierda) y ASM-/- (derecha) control y tratados con SAHA. Como control de carga se usó un anticuerpo contra la proteína ATP6V1A. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de PMCA.  $n = 7$ ,  $t$  de Student,  $P_{ASM+/+} = 0.014$ ,  $P_{ASM-/-} = 0.011$ .

devuelve al laberinto pero esta vez con el tercer brazo abierto. Si el ratón es capaz de orientarse en la estructura pasará más tiempo explorando el tercer brazo (nuevo) que los otros dos. La cuantificación del tiempo que los ratones pasan explorando el brazo nuevo respecto al tiempo total de exploración es directamente proporcional a la capacidad de memoria espacial. La comparación de los ratones ASM+/+ con los ASM-/- confirmó las deficiencias de estos últimos (45 y 23 % en el brazo nuevo, respectivamente). Sin embargo, el tratamiento oral con SAHA aumentó el tiempo de exploración del brazo nuevo en los ratones ASM-/- (44 %) mientras que no produjo cambios en los ratones ASM+/+ (38 %) (Figura 4.33).

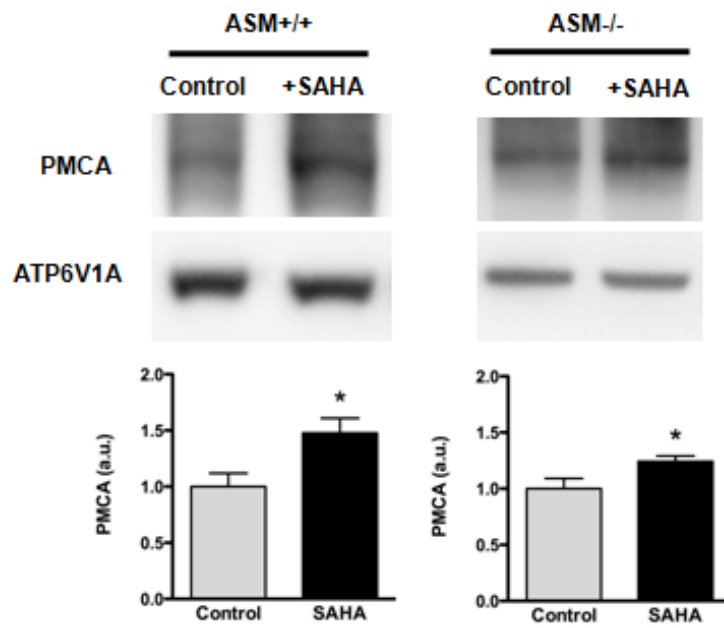
Para determinar si la mayor supervivencia neuronal observada en el cerebelo de los ratones ASM-/- tratados con SAHA se reflejaba en una mayor coordinación motora se usó el test del rotarod. Éste consiste en colocar a los animales sobre un cilindro giratorio y medir el tiempo que tardan en caer. Los ratones ASM-/- tienen pobres resultados en esta prueba (Otterbach et al., 1995). Se realizaron cuatro intentos para cada ratón separados entre sí por una hora de diferencia. Confirmando los resultados anteriormente publicados observamos que los ratones ASM-/- tardan menos tiempo en caer que los ASM+/+ en los dos últimos intentos. El tratamiento con SAHA aumentó el tiempo que tardan los ratones ASM-/- en caer del cilindro



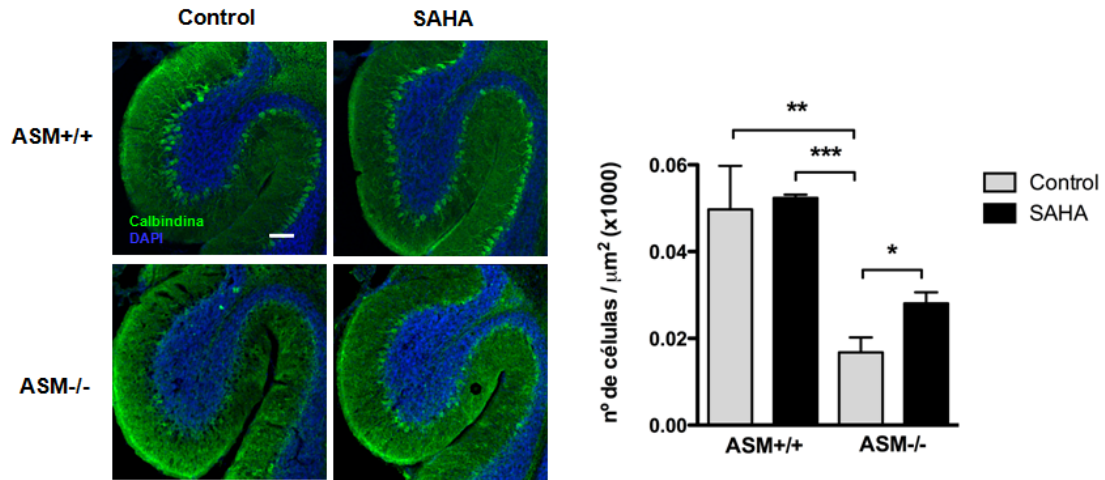
**Figura 4.30. El tratamiento con SAHA reduce el estrés oxidativo en el hipocampo de ratones ASM-/-.** Imágenes representativas del marcaje con DHR (rojo) y DAPI (azul) en la región CA1 del hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- control y tratados con SAHA. Barra de escala = 10 μm. Las gráficas representan la media ± SEM de los niveles de ROS. n = 7, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima,  $P_{ASM+/+/ASM-/-} = 0.015$ ,  $P_{ASM+/+saha/ASM-/-} = 0.007$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.0004$ , n.s. = no significativo.

(50 %) mientras que no afectó el comportamiento de los ratones ASM+/+ (Figura 4.34). La recuperación parcial, y no total, de la función motora podría explicarse porque a pesar de que SAHA previene la muerte de las células de Purkinje de manera significativa sigue dándose una pérdida de neuronas respecto a los ratones ASM+/+.

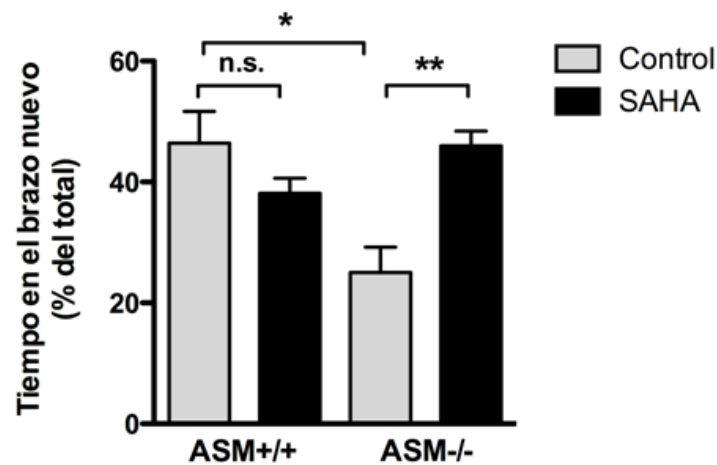
Estos datos demuestran que el tratamiento oral con SAHA es capaz de revertir completamente el déficit de memoria espacial y de mejorar los problemas motores en los ratones ASM-/-.



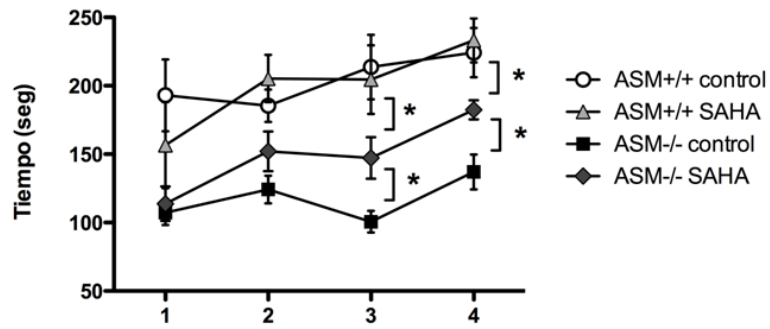
**Figura 4.31. El tratamiento con SAHA aumenta los niveles de PMCA en extractos de membrana de cerebelo.** Western blot de extractos de membrana de cerebelo de ratones ASM+/+ (izquierda) y ASM-/- (derecha) control y tratados con SAHA. Como control de carga se usó un anticuerpo contra la proteína ATP6V1A. Las gráficas representan la media  $\pm$  SEM de los niveles de PMCA.  $n = 7$ ,  $t$  de Student,  $P_{ASM+/+} = 0.020$ ,  $P_{ASM-/-} = 0.032$ .



**Figura 4.32. El tratamiento con SAHA protege frente a la muerte neuronal en el cerebelo de ratones ASM-/-.** Imágenes representativas de la tinción con calbindina (verde), que marca las neuronas de Purkinje, y DAPI (azul) en los lóbulos posteriores del cerebelo de ratones ASM+/+ y ASM-/- control y tratados con SAHA. Barra de escala = 100 μm. La gráfica representa la media ± SEM del número de células positivas para calbindina por unidad de área. n = 7, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima,  $P_{ASM+/+/ASM-/-} = 0.001$ ,  $P_{ASM+/+saha/ASM-/-} = 0.0005$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.049$ .



**Figura 4.33. El tratamiento con SAHA previene los déficits de memoria espacial de los ratones ASM-/-.** La gráfica representa la media ± SEM del tiempo que los ratones pasan explorando el brazo nuevo del laberinto en la prueba de la Y, en porcentaje respecto al tiempo total explorando. n = 7, ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima,  $P_{ASM+/+/ASM-/-} = 0.024$ ,  $P_{ASM+/+/ASM+/+saha} = 0.5$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.003$ , n.s. = no significativo.



**Figura 4.34. El tratamiento con SAHA mejora la coordinación motora de los ratones ASM-/-. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM del tiempo que los ratones tardan en caer del cilindro en rotación en el test rotarod en cada una de las cuatro pruebas realizadas.  $n = 7$ , ANOVA de dos vías seguida del *post hoc* de diferencia significativa mínima. Para la prueba 3:  $P_{ASM+/+/ASM-/-saha} = 0.034$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.037$ . Para la prueba 4:  $P_{ASM+/+/ASM-/-saha} = 0.028$ ,  $P_{ASM-/-/ASM-/-saha} = 0.038$ .**



## 5. DISCUSIÓN

Los resultados experimentales de esta tesis, obtenidos en el cerebro de un paciente y en el ratón modelo de NPA, identifican el estrés oxidativo como un factor determinante en la patología neuronal de esta enfermedad. La caracterización del mecanismo molecular subyacente nos ha permitido concluir que el estrés oxidativo está en gran parte provocado por el incremento de los niveles de calcio intracelular debido a la deficiencia de PMCA, a su vez causada por los altos niveles de SM. Esta información ha sido la base para ensayar *in vitro* e *in vivo* una estrategia farmacológica que previene estas características patológicas. Creemos que, en conjunto, estos datos ayudan a comprender mejor la NPA aportando perspectivas para un potencial tratamiento. Además desvelan nuevas funciones de la SM en la membrana plasmática como regulador de los mecanismos de extrusión de calcio y del estrés oxidativo en neuronas.

### 5.1. El estrés oxidativo y su especial impacto en neuronas

Aunque el estrés oxidativo puede causar daños en cualquier tipo celular varias características del cerebro y de las neuronas hacen a estas células especialmente sensibles a este tipo de estrés. En primer lugar, las células del cerebro utilizan alrededor del 20 % del oxígeno consumido por el organismo aunque sólo constituyen el 2 % del peso corporal (Clarke and Sokoloff, 1999) lo que supone un elevado potencial para generar gran cantidad de ROS durante la fosforilación oxidativa. Además, en diferentes regiones del cerebro se ha descrito un alto contenido en hierro (Gerlach et al., 1994) que puede catalizar la producción de ROS mediante la reacción de Fenton. En tercer lugar, el cerebro es rico en lípidos con ácidos grasos insaturados que son especialmente susceptibles a la peroxidación (Halliwell, 1992; Chen et al., 2008). Por otra parte, la actividad de la SOD, la catalasa y la glutatión peroxidasa es moderada en comparación con otros órganos como hígado o riñones (Cooper and Kristal, 1997; Ho et al., 1997) y los niveles en neuronas de glutatión, el principal antioxidante, son más bajos que en astrocitos (Rice and Russo-Menna, 1998). Nuestros resultados han revelado altos niveles de estrés oxidativo en las neuronas de un paciente de NPA y de ratones modelo para esta enfermedad. Esta observación, junto con las característi-

cas recién comentadas, podrían explicar por qué, aunque la NPA afecta también a órganos periféricos, la alteración neurológica es la más destacada en la enfermedad y la responsable de la muerte temprana.

Nuestros datos indican que el elevado estrés afecta a todas las áreas cerebrales analizadas. Sin embargo, decidimos centrar nuestros estudios en el hipocampo por ser una región especialmente sensible al estrés oxidativo que además está directamente implicada en los procesos de aprendizaje y memoria (Cardozo-Pelaez et al., 2000). En concreto, analizamos las neuronas piramidales de CA1 que son aún más sensibles a este estrés que las que se encuentran en CA3 a pesar de su proximidad física y de que son morfológicamente similares (Wilde et al., 1997; Vornov et al., 1998; Sarnowska, 2002; Wang et al., 2005). Este patrón de hipersensibilidad también se da frente a otros insultos como la hipoxia y la isquemia (Schmidt-Kastner and Freund, 1991; Olsson et al., 2003) o en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Morrison and Hof, 2002). Entre las causas de la gran vulnerabilidad de las neuronas en CA1 están los mayores niveles de ROS basales, en concreto del radical superóxido (Wang et al., 2005), y mitocondriales (Mattiasson et al., 2003) y la menor capacidad de expresión de genes antioxidantes (Wang et al., 2005).

Utilizando ratones ASM-/- demostramos que los altos niveles de ROS en estas neuronas están acompañados de la acumulación de gránulos de lipofusina. La lipofusina es una mezcla de proteínas oxidadas (30-70 %) y de residuos de la degradación de lípidos (20-50 %) y en menor cantidad de carbohidratos (4-7 %) (Terman et al., 1998) y metales, especialmente hierro (Jolly et al., 1995) (Brun and Brunk, 1970). La oxidación y agregación de estas moléculas no sólo impide su correcto funcionamiento sino que además los agregados no pueden ser degradados ni expulsados al medio extracelular, acumulándose con el tiempo en células postmitóticas. El estrés oxidativo es el origen de estos agregados al inducir entrecruzamiento de las macromoléculas lo que las hace resistentes a la degradación por el lisosoma (Kikugawa et al., 1989). Así, paralelamente a la presencia de estrés oxidativo, la acumulación de lipofusina se ha descrito en varias LSDs como la enfermedad de Gaucher (Conradi et al., 1984; Pampols et al., 1999), la mucopolipidosis tipo IV (Goldin et al., 1995) o la lipofuscinosis ceroides neuronal (Peltonen et al., 2000).

Gracias a este trabajo de tesis sabemos que el aumento del estrés oxidativo en neuronas y la consecuente acumulación de gránulos de lipofusina también tienen lugar en la NPA, pudiendo ser un factor clave en la patología. Analizar las causas de estas alteraciones ha sido uno de los objetivos de esta tesis que discutimos a continuación.

## 5.2. Las alteraciones en la homeostasis de calcio son un mecanismo patológico común en las LSDs

Nuestros resultados demuestran que la alteración de la homeostasis de calcio es en gran parte responsable del elevado estrés oxidativo en neuronas de ratones modelo para NPA.

Las alteraciones en la homeostasis de calcio contribuyen a la patología de numerosas LSDs aunque, como sucede con el estrés oxidativo, el mecanismo que genera estas alteraciones no es el mismo en cada caso.

Uno de los sistemas intracelulares de tamponamiento de calcio que se ve afectado en varias LSDs es el RE. En la enfermedad de Gaucher la acumulación de glucosilceramida produce directamente una estimulación aberrante del receptor de rianodina en este compartimento (Korkotian et al., 1999; Lloyd-Evans et al., 2003). En la enfermedad de Sandhoff el gangliósido GM2 inhibe la actividad de la ATPasa SERCA, reduciendo la tasa de incorporación de calcio al RE e induciendo un aumento de calcio intracelular (Pelled et al., 2003).

Otro de los orgánulos reguladores de calcio afectados en diversas LSDs es la mitocondria. En un modelo neuronal de gangliosidosis GM1 la acumulación de este lípido en las membranas de RE asociadas a mitocondrias resulta en su permeabilización y en la activación de vías apoptóticas (Sano et al., 2009). En fibroblastos de pacientes con mucopolipidosis tipo IV, en la que se acumulan fosfolípidos, mucopolisacáridos y gangliósidos, se produce fragmentación mitocondrial y disminución de la capacidad de tamponamiento (Jennings et al., 2006).

En otras LSDs como la NPC se han descrito alteraciones de la homeostasis de calcio que no parecen deberse a anomalías en el RE o la mitocondria sino en otro de los orgánulos reguladores de calcio: el lisosoma (Lloyd-Evans et al., 2008; Shen et al., 2012). El lisosoma puede contener una concentración de calcio de hasta 600  $\mu\text{M}$  (Christensen et al., 2002; Lloyd-Evans et al., 2008) similar a la descrita para el RE (Bygrave and Benedetti, 1996). La correcta concentración de este catión en el sistema endolisosomal asegura el tráfico, reciclaje y fusión de vesículas (Lloyd-Evans and Platt, 2011). El contenido de calcio del lisosoma se regula gracias a la acción de un segundo mensajero, el NAADP (*Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate*), que estimula a la familia de canales TPC (*Lysosomal Two-pore Channel*) (Churchill et al., 2002). En fibroblastos de pacientes de NPC se describió una disminución de los niveles de calcio en el compartimento endolisosomal que se atribuyó a la acumulación de esfingosina (Lloyd-Evans et al., 2008). Sin embargo, un estudio posterior reveló que el principal canal de calcio lisosomal, TRPML1 (*Mucolipin Transient Receptor Potential Channel 1*) se inhibe por el aumento de SM en fibroblastos derivados de pacientes NPC y NPA (Shen et al., 2012), reduciendo la liberación de calcio desde el lisosoma. Estos resultados llevaron a proponer que la estimulación de la liberación de calcio desde este orgánulo podría ser beneficiosa pa-

ra estas enfermedades. De hecho, el aumento de la actividad de TRPML1 redujo la alteración lisosomal y la acumulación de lípidos en células NPC (Shen et al., 2012). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que esta estrategia no sería aconsejable para el caso de NPA, ya que al contrario de lo descrito en células NPC, los niveles de calcio citosólico no están disminuidos sino aumentados y estimular la liberación de este catión desde el lisosoma contribuiría a empeorar este defecto.

Aunque no está directamente relacionado con la homeostasis de calcio, es importante destacar que la acumulación de SM en lisosomas de neuronas ASM-/- provoca su permeabilización parcial con la consecuente liberación al citosol de ciertas proteasas lisosomales como la cathepsina B. A su vez, esto causa problemas en la degradación de los autofagolisosomas bloqueando así el flujo autofágico (Gabandé-Rodríguez et al., 2014). La pérdida de integridad de la membrana lisosomal se produce en otras LSDs como NPC (Amritraj et al., 2009) o la mucopolisacaridosis de tipo I (Pereira et al., 2010). Se sabe que un aumento de calcio citosólico puede activar enzimas como la fosfolipasa A2 o la C, que generan metabolitos que pueden afectar a la permeabilidad de la membrana lisosomal (Johansson et al., 2010). Los altos niveles de ROS también pueden contribuir a este efecto mediante la modificación de los lípidos de esta membrana por peroxidación (Wong-Ekkabut et al., 2007). De esta manera, las alteraciones de calcio y estrés oxidativo descritas en esta tesis podrían estar entre los factores que contribuyen a la permeabilización lisosomal en NPA.

Pocos estudios han investigado de forma directa las alteraciones del calcio en el contexto de NPA. Experimentos realizados en microsomas preparados a partir de extractos de cerebelo de ratones ASM-/- indicaron una disminución en la captación de calcio debida a una deficiencia en los niveles de SERCA y del receptor IP3R que se agrava con la edad (Ginzburg and Futerman, 2005). Sin embargo, esta alteración es específica del cerebelo y no provocada por la SM sino por la pérdida de células de Purkinje en las que SERCA e IP3R son especialmente abundantes (Villa et al., 1991; Wu et al., 1995; Meldolesi, 2002).

Nuestros resultados confirman que la actividad de SERCA no está afectada en el hipocampo de ratones ASM-/- sugiriendo que el aumento de calcio citosólico no se debe a alteraciones del tamponamiento por parte del RE. Nuestros datos señalan como responsable a la baja actividad de la bomba de extrusión en la membrana plasmática PMCA como consecuencia de la acumulación de la SM. Es la primera vez que el control de calcio en este sitio celular se relaciona con una LSD.

### **5.3. La SM como regulador de la homeostasis de calcio neuronal a través de la PMCA**

La SM está particularmente enriquecida en las membranas neuronales donde lleva a cabo importantes funciones. Niveles adecuados de SM son necesarios para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad axonal (Ledesma et al., 1999; Galvan et al., 2008) y para la plasticidad sináptica (Camoletto et al., 2009; Arroyo et

al., 2014). En esta tesis describimos que la SM de la membrana plasmática también juega un relevante papel en la regulación de la homeostasis del calcio neuronal. Los cambios en niveles de SM no parecen afectar a una de las principales bombas de calcio en este sitio celular, el antiportador NCX. Sin embargo, el aumento de SM disminuye la actividad del otro sistema de extrusión de calcio en la membrana celular, la PMCA. Esta bomba funciona a expensas del consumo de ATP y es particularmente eficaz en mantener los niveles basales de calcio debido a su mayor afinidad por este catión (Strehler et al., 2007).

Nuestros resultados apuntan a que el efecto inhibitorio de la SM sobre PMCA se deba a la influencia sobre su actividad y no sobre sus niveles. Varias posibilidades, no excluyentes, podrían explicarlo. Se podría tratar de un efecto directo del lípido sobre la ATPasa ya que se ha descrito en liposomas que un aumento en la proporción SM/colesterol produce cambios en la estructura de la proteína haciéndola más compacta tanto en sus dominios hidrofóbicos como hidrofílicos (Pang et al., 2005). Además, el aumento de SM podría tener una influencia indirecta sobre PMCA afectando su interacción con proteínas reguladoras o la actividad de estas últimas. Esta posibilidad está apoyada por la alteración que observamos en la distribución de PMCA en rafts lipídicos donde se ha descrito que la proteína es más activa (Strehler et al., 2007). La reducida presencia de PMCA en los rafts de neuronas ASM-/- podría evitar su interacción con proteínas como la PKC, una de las quinasas que fosforila y activa PMCA, y que reside preferentemente en estos dominios de membrana (Pike, 2003). Además, estudios en liposomas han descrito que el aumento de SM puede inhibir la actividad de esta quinasa (Pang et al., 2005). Por otro lado, el estrés oxidativo promovido por la alteración de calcio mediada por PMCA podría retroalimentar la deficiencia de esta última que es particularmente sensible a altos niveles de ROS. Las modificaciones oxidativas en la PMCA producen cambios en su estructura induciendo su agregación (Zaidi and Michaelis, 1999).

### 5.4. PMCA y neurodegeneración

Los estudios en modelos knockout para diferentes isoformas de la PMCA han permitido conocer en más detalle su función en diferentes tejidos y el impacto de su deficiencia. El ratón que carece de PMCA1 es letal en estadios embrionarios tempranos poniendo de manifiesto la importancia de esta isoforma en etapas iniciales del desarrollo y la organogénesis (Okunade et al., 2004). Esto sucede también con el gen que codifica para PMCA3, que no se ha podido modificar todavía con éxito. Sin embargo, se ha detectado una mutación de cambio de sentido en este gen (G1107D) que afecta al sitio de unión de calmodulina y que causa la ataxia cerebelar congénita ligada al cromosoma X (Zanni et al., 2012). La PMCA3 tiene una alta expresión en el cerebelo, particularmente en los terminales presinápticos de la sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje (Burette and Weinberg, 2007) y su mutación retrasa el tamponamiento de calcio después de un estímulo (Zanni et al., 2012). El ratón deficiente para el gen que codifica para PMCA2, isoforma con alta expresión en

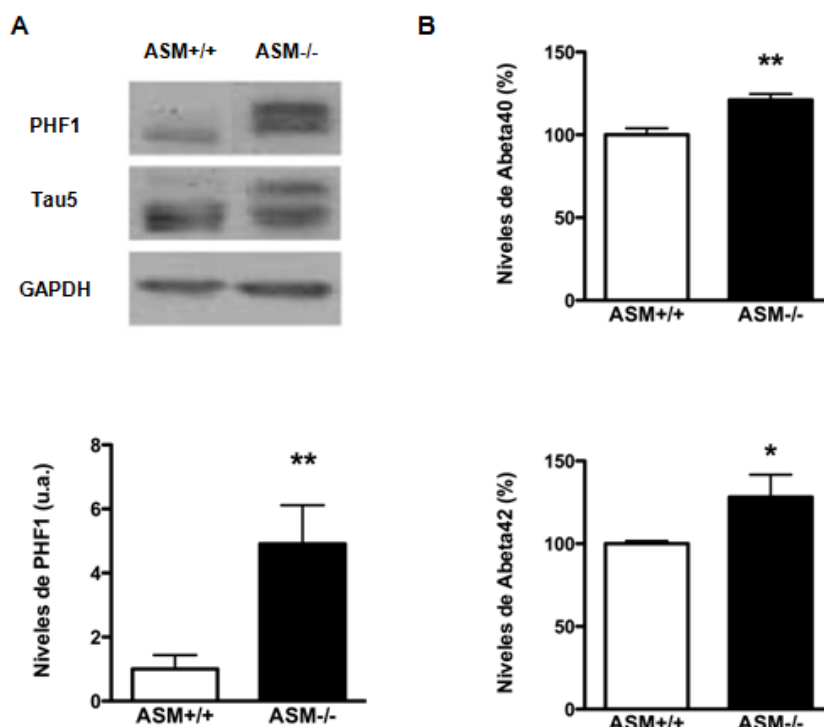
las dendritas de las células de Purkinje (Burette y Weinberg, 2007), también presenta problemas motores y ataxia con un espesor reducido del córtex cerebeloso (Kozel et al., 1998). Las células de Purkinje del ratón carente de PMCA2 no degeneran pero presentan dendritas atrofiadas (Empson et al., 2007) y un aumento de calcio basal como ocurre tras la inhibición farmacológica de la actividad PMCA en otras células excitables (Wanaverbecq et al., 2003; Choi and Eisner, 1999). La supervivencia de estas neuronas podría explicarse porque otras isoformas presentes, como PMCA3, compensan al menos en parte la pérdida de función de PMCA2.

El análisis de los ratones mutantes para varias isoformas de PMCA revela como característica común la afectación del cerebelo y las células de Purkinje que causan problemas motores. Estas anomalías coinciden con las que presentan los ratones ASM-/- donde estas neuronas son las primeras en degenerar causando ataxia a temprana edad. Estas evidencias, junto con el hecho de que el tratamiento con SAHA aumenta la actividad de PMCA tanto en hipocampo como en cerebelo limitando la muerte de las células de Purkinje, apoyan el protagonismo de las alteraciones en PMCA y la homeostasis del calcio en la neurodegeneración en NPA.

Alteraciones en la PMCA también se han descrito en diferentes patologías neurodegenerativas y durante el envejecimiento. La actividad de PMCA, pero no de otras ATPasas como SERCA o SPCA, está reducida en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer lo que se ha atribuido a la acumulación de péptido  $\beta$ -amiloide (Berrocal et al., 2009; Mata et al., 2011). Este efecto parece ser específico para la isoforma PMCA4 (Berrocal et al., 2009). Varios estudios han demostrado que tanto la actividad como los niveles de PMCA en membranas de cerebro disminuyen durante el envejecimiento fisiológico (Michaelis et al., 1984; Michaelis et al., 1996). Esta disminución de actividad se ha atribuido, al menos en parte, a los cambios estructurales de calmodulina que ocurren con la edad y que reducen su interacción con otras proteínas como PMCA (Zaidi et al., 1998; Gao et al., 2001). Pero además, recientemente se ha comprobado que en ratones viejos los niveles de proteína PMCA en los rafts de membranas sinápticas están reducidos (Jiang et al., 2012), lo que también explicaría las diferencias en actividad.

Resultados obtenidos durante esta tesis doctoral, que no se han incluido en los resultados, nos permiten proponer que el aumento de la SM en la membrana plasmática de neuronas envejecidas podría contribuir a la deficiente actividad de PMCA durante el envejecimiento. Las neuronas hipocampales en cultivo sufren un proceso de envejecimiento que incluye aumento de SM y de estrés oxidativo considerándose un buen modelo *in vitro* para analizar este proceso (Sodero et al., 2011). Comprobamos que los niveles de SM en neuronas hipocampales de ratones ASM+/+ cultivadas por más de 20 días son similares a los de neuronas de ratones ASM-/- de 12 días donde hemos demostrado la deficiencia en PMCA. Es interesante destacar además que en un estadio tardío de la enfermedad (7 meses), cuando ya se ha dado un aumento crónico de los niveles de SM, los ratones ASM-/- muestran características patológicas típicas de cerebros de pacientes con Alzheimer como la fosforilación aberrante de Tau y el aumento de péptido  $\beta$ -amilode que se desencadenan por los altos niveles

de SM (Figura 5.1).



**Figura 5.1. Aumento de la fosforilación de Tau y de los niveles de Abeta 40 y 42 en el hipocampo de ratones ASM-/-.** A) Western blot con un anticuerpo contra la proteína Tau fosforilada en el epítipo PHF1 y Tau total (Tau5) en extractos totales de hipocampo de ratones ASM+/+ y ASM-/- de 7 meses de edad. Como control de carga se usó GAPDH. La gráfica representa la media  $\pm$  SEM de los niveles de proteína fosforilada respecto a los niveles totales. B) Niveles de péptido Abeta 40 (arriba) y 42 (abajo) en extractos de hipocampo de ratones de 7 meses de edad.  $n = 7$ ,  $t$  de Student,  $P_{PHF1} = 0.006$ ,  $P_{Abeta40} = 0.008$ ;  $P_{Abeta42} = 0.035$ .

## 5.5. Hacia una terapia para NPA

NPA es una patología devastadora que conduce a la muerte prematura, a los 2-3 años de edad, sin que exista tratamiento alguno. Varias razones hacen difícil encontrar estrategias terapéuticas aplicables a los pacientes. Además de la baja incidencia de la enfermedad, que complica la disponibilidad de muestras para profundizar en la investigación, la NPA se manifiesta y progresa muy rápidamente. Aunque los pacientes nacen aparentemente sanos (lo que sugiere que la ASM no tiene un destacado papel durante el desarrollo fetal) los primeros síntomas aparecen a los 3-6 meses de edad cuando la acumulación de SM ya es significativa. Para conseguir que el daño derivado de la acumulación de SM sea reversible las posibles terapias deberían iniciarse en los primeros meses de vida. Además, al ser el cerebro el órgano clave en la

patología, cualquier estrategia farmacológica no invasiva debe ser capaz de superar la barrera hematoencefálica lo que limita mucho las opciones.

La existencia del ratón ASM-/-, que reproduce fielmente la enfermedad, representa una gran ayuda para entender los mecanismos patológicos y ensayar estrategias para prevenirlos o revertirlos. Como elemento positivo está también el hecho de que una actividad residual mínima de la ASM es suficiente para evitar la afectación neurológica. Esto se ha demostrado en pacientes de NPB y en ratones con mutaciones similares a las de estos pacientes que permiten una actividad del 8 % de la normal (Jones et al., 2008). Estos datos indican que una recuperación mínima de la actividad de ASM podría ser suficiente para evitar, al menos, la patología en cerebro.

Diferentes aproximaciones se han propuesto para tratar las LSDs. Algunas están enfocadas a aumentar de forma exógena los niveles de la enzima defectiva mediante la terapia de reemplazo enzimático. Otras se basan en el uso de pequeñas moléculas que estabilicen la enzima para recuperar su actividad, como las chaperonas, o que reduzcan los niveles del sustrato acumulado. Por último, la terapia génica y celular también está siendo evaluada en varias LSDs. Varias de estas aproximaciones se han ensayado en ratones ASM-/- aunque sin mucho éxito. Así, la terapia de reemplazo enzimático mediante la infusión intravenosa de la enzima ASM recombinante (Miranda et al., 2000b), el trasplante de médula ósea (Miranda et al., 1998) o la terapia génica introduciendo el gen de la ASM humana mediante vectores virales (Miranda et al., 2000a), han logrado efectos positivos a nivel periférico pero no en cerebro o en la progresión neurológica de la enfermedad. La inyección estereotáxica en cerebro de adenovirus que expresan la ASM consiguió una disminución local de los niveles de SM (Dodge et al., 2005), pero causa respuesta inflamatoria y es una estrategia invasiva de difícil aplicación a pacientes.

La búsqueda de estrategias farmacológicas para NPA es por tanto necesaria. Cabe destacar en este sentido los resultados obtenidos expresando la chaperona Hsp70 (*Heat Shock Protein 70*), que estabiliza la membrana lisosomal y mejora la actividad de la enzima, reduciendo los niveles de SM en fibroblastos de pacientes de NPA y NPC (Kirkegaard et al., 2010). En este momento se está preparando un primer ensayo clínico en pacientes de NPC con un fármaco, el arimoclomol, que activa a la Hsp70 y cruza la barrera hematoencefálica. En un trabajo publicado recientemente por nuestro laboratorio se demostraron los efectos beneficiosos del tratamiento oral con dexametasona sobre las alteraciones sinápticas y la neurodegeneración en los ratones ASM-/- . La dexametasona es un glucocorticoide sintético que se usa en el tratamiento de varias enfermedades como el asma, meningitis o cáncer (van de Beek et al., 2010; De Cassan et al., 2012) por sus propiedades antiinflamatorias (Laste et al., 2013). Además de estas propiedades, que son beneficiosas en varias LSDs donde se han descrito procesos de inflamación (Vitner et al., 2012; Farfel-Becker et al., 2011; Di Malta et al., 2012), la dexametasona es un activador de la esfingomielinasa neutral (NSM) (Ramachandran et al., 1990). Es precisamente esta característica, así como la capacidad de la dexametasona de atravesar la barrera hematoencefálica



(Stumpf et al., 1989), lo que permitió reducir los niveles de SM en cerebro, prevenir las anomalías en las espinas dendríticas y aumentar la supervivencia de las células de Purkinje en ratones ASM-/- tras el tratamiento oral (Arroyo et al., 2014). Aunque estos resultados abren la esperanza de que la dexametasona pueda convertirse en un fármaco eficaz para NPA, la dificultad de cruzar la barrera hace necesarias dosis de este glucocorticoide que tendrían importantes efectos secundarios en tratamientos crónicos. Por este motivo actualmente en el laboratorio se está ensayando la posibilidad de encapsular la dexametasona en nanopartículas que eviten su degradación y faciliten su paso a cerebro con la idea de rebajar la dosis necesaria.

Los resultados de esta tesis doctoral permiten proponer otra alternativa terapéutica farmacológica. Demostramos que el tratamiento oral de los ratones ASM-/- con el inhibidor de las deacetilasas de histonas, SAHA, previene la aparición de estrés oxidativo y reduce la muerte de las células de Purkinje. Estas mejoras tienen un reflejo funcional en la mayor habilidad de los ratones tratados en tests de comportamiento motor y de memoria espacial. Son varias las características que hacen de SAHA una posibilidad real de terapia. En primer lugar, este compuesto atraviesa la barrera hematoencefálica (Hockly et al., 2003) lo que permite su administración no invasiva en dosis relativamente bajas. Además, es un compuesto ya aprobado para uso clínico en pacientes con linfoma cutáneo de células T. El uso de inhibidores de histona deacetilasas como SAHA en el tratamiento del cáncer se basa en que estas enzimas están sobreexpresadas en muchos tipos de tumores (Song et al., 2005; Halkidou et al., 2004; Zhu et al., 2004; Fenrick and Hiebert, 1998; Lemercier et al., 2002).

Nuestros resultados demuestran que la capacidad de SAHA de aumentar los niveles de varias isoformas de PMCA en un modelo celular de cáncer de mama (Varga et al., 2014) también se da en cerebro. Los efectos beneficiosos en los ratones ASM-/- se explicarían por esta capacidad que minimiza las alteraciones de la homeostasis del calcio reduciendo el estrés oxidativo. Nuestros datos descartan que SAHA tenga efectos sobre los niveles de SM que siguen elevados en los ratones tratados. Esta observación apoya la validez de tratamientos sintomáticos para NPA aunque no corrijan la causa primaria de la enfermedad.

Es importante destacar que tratamientos con SAHA se han usado en modelos murinos para diferentes enfermedades neurodegenerativas y LSDs. En modelos de la enfermedad de Huntington, donde se produce una desregulación transcripcional (Cha et al., 1998; Luthi-Carter et al., 2000; Cha, 2007), SAHA previene los fenotipos aberrantes clásicos de la patología como los agregados de huntingtina y la deficiente coordinación motora (Hockly et al., 2003; Mielcarek et al., 2011). En fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Gaucher o de NPC, SAHA aumenta los niveles de las proteínas mutadas, la glucocerebrosidasa (GCasa) y la Npc1 respectivamente, probablemente porque mejora su estabilidad lo que reduce la acumulación de lípidos (Lu et al., 2011; Pipalia et al., 2011). Actualmente la eficacia de SAHA se está probando en un ensayo clínico en pacientes de NPC.

Esperamos que los resultados de esta tesis, que describen una nueva vía pa-

tológica en NPA y ensayan una estrategia para evitarla, contribuyan al desarrollo de tratamientos para una enfermedad hoy en día incurable como NPA.

## 6. CONCLUSIONES

1. La neurodegeneración caracteriza regiones cerebrales (corteza, hipocampo y cerebelo) de un paciente de NPA.
2. El cerebro del paciente de NPA y de ratones ASM-/-, que son modelo para la enfermedad presentan signos de estrés oxidativo como la acumulación de lipofuscina y altos niveles de ROS.
3. El estrés oxidativo en neuronas ASM-/- es consecuencia del aumento de los niveles de calcio intracelular provocado por el incremento de SM.
4. La desregulación de calcio en neuronas ASM-/- es debida a la disminución de la actividad de la bomba de calcio de la membrana plasmática PMCA.
5. La acumulación de SM reduce la actividad de la PMCA y altera su distribución en los rafts lipídicos de membrana.
6. El inhibidor de deacetilasas de histonas, SAHA, aumenta los niveles de PMCA y reduce el estrés oxidativo en neuronas ASM-/- en cultivo.
7. El tratamiento oral con SAHA aumenta los niveles de PMCA en hipocampo y cerebelo previniendo el estrés oxidativo y la neurodegeneración en ratones ASM-/-.
8. El tratamiento oral con SAHA mejora la capacidad de memoria y motora en ratones ASM-/-.



# Bibliografía

Amritraj, A., Peake, K., Kodam, A., Salio, C., Merighi, A., Vance, J.E., and Kar, S. (2009). Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice. *Am. J. Pathol.* *175*, 2540-2556.

Armstrong, C.L., Krueger-Naug, A.M., Currie, R.W., and Hawkes, R. (2001). Constitutive expression of heat shock protein HSP25 in the central nervous system of the developing and adult mouse. *J. Comp. Neurol.* *434*, 262-274.

Arroyo, A.I., Camoletto, P.G., Morando, L., Sassoe-Pognetto, M., Giustetto, M., Van Veldhoven, P.P., Schuchman, E.H., and Ledesma, M.D. (2014). Pharmacological reversion of sphingomyelin-induced dendritic spine anomalies in a Niemann Pick disease type A mouse model. *EMBO Mol. Med.* *6*, 398-413.

Van de Beek, D., Farrar, J.J., de Gans, J., Mai, N.T.H., Molyneux, E.M., Peltola, H., Peto, T.E., Roine, I., Scarborough, M., Schultz, C., et al. (2010). Adjunctive dexamethasone in bacterial meningitis: a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Neurol.* *9*, 254-263.

Berridge, M.J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* *21* , 13-26.

Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1* , 11-21.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 517-529.

Berrocal, M., Marcos, D., Sepúlveda, M.R., Pérez, M., Avila, J., and Mata, A.M. (2009). Altered Ca<sup>2+</sup> dependence of synaptosomal plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in human brain affected by Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 1826-1834.

Bhatt, S., Ashlock, B.M., Toomey, N.L., Diaz, L.A., Mesri, E.A., Lossos, I.S., and Ramos, J.C. (2013). Efficacious proteasome/HDAC inhibitor combination therapy for primary effusion lymphoma. *J. Clin. Invest.* *123*, 2616-2628.

Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P., and Lodish, H.F. (1997). Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* *272*, 13793-13802.

Bourguignon, L.Y.W., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., and Gilad, E. (2004). CD44 Interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger (NHE1) Creates Acidic Microenvironments Leading to Hyaluronidase-2 and Cathepsin B Activation and Breast Tumor Cell Invasion. *J. Biol. Chem.* *279* , 26991-27007.

- Brady, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B., and Fredrickson, D.S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *55*, 366-369.
- Brandt, P., Ibrahim, E., Bruns, G.A., and Neve, R.L. (1992). Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca(2+)-pumping ATPase isoform PMCA2. *Genomics* *14*, 484-487.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2013). The plasma membrane calcium pump in health and disease. *FEBS J.* *280*, 5385-5397.
- Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *Eur. J. Biochem. FEBS* *204*, 939-946.
- Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533-544.
- Brun, A., and Brunk, U. (1970). Histochemical indications for lysosomal localization of heavy metals in normal rat brain and liver. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *18*, 820-827.
- Buccinna, B., Piccinini, M., Prinetti, A., Scandroglio, F., Prioni, S., Valsecchi, M., Votta, B., Grifoni, S., Lupino, E., Ramondetti, C., et al. (2009). Alterations of myelin-specific proteins and sphingolipids characterize the brains of acid sphingomyelinase-deficient mice, an animal model of Niemann-Pick disease type A. *J. Neurochem.* *109*, 105-115.
- Burette, A., and Weinberg, R.J. (2007). Perisynaptic organization of plasma membrane calcium pumps in cerebellar cortex. *J. Comp. Neurol.* *500*, 1127-1135.
- Burette, A., Rockwood, J.M., Strehler, E.E., and Weinberg, R.J. (2003). Isoform-specific distribution of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *467*, 464-476.
- Busse, R., and Mülsch, A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* *265*, 133-136.
- Bygrave, F.L., and Benedetti, A. (1996). What is the concentration of calcium ions in the endoplasmic reticulum? *Cell Calcium* *19*, 547-551.
- Caceres, A., Banker, G., Steward, O., Binder, L., and Payne, M. (1984). MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* *315*, 314-318.
- Camoletto, P.G., Vara, H., Morando, L., Connell, E., Marletto, F.P., Giustetto, M., Sassoe-Pognetto, M., Van Veldhoven, P.P., and Ledesma, M.D. (2009). Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18. *PloS One* *4*, e5310.
- Carafoli, E. (1994). Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *8*, 993-1002.
- Carafoli, E., and Zurini, M. (1982). The Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta* *683*,

279-301.

Cardozo-Pelaez, F., Brooks, P.J., Stedeford, T., Song, S., and Sanchez-Ramos, J. (2000). DNA damage, repair, and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radic. Biol. Med.* *28*, 779-785.

De Cassan, C., Fiorino, G., and Danese, S. (2012). Second-generation corticosteroids for the treatment of Crohn's disease and ulcerative colitis: more effective and less side effects? *Dig. Dis. Basel Switz.* *30*, 368-375.

Èesen, M.H., Pegan, K., Spes, A., and Turk, B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp. Cell Res.* *318*, 1245-1251.

Cha, J.-H.J. (2007). Transcriptional signatures in Huntington's disease. *Prog. Neurobiol.* *83*, 228-248.

Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P., and Young, A.B. (1998). Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 6480-6485.

Chakraborty, M., and Jiang, X.-C. (2013). Sphingomyelin and Its Role in Cellular Signaling. In *Lipid-Mediated Protein Signaling*, D.G.S. Capelluto, ed. (Springer Netherlands), pp. 1-14.

Charruyer, A., Grazide, S., Bezombes, C., Müller, S., Laurent, G., and Jaffrézou, J.-P. (2005). UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J. Biol. Chem.* *280*, 19196-19204.

Chen, C.T., Green, J.T., Orr, S.K., and Bazinet, R.P. (2008). Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* *79*, 85-91.

Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., and Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* *176*, 599-604.

Choi, H.S., and Eisner, D.A. (1999). The role of sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the regulation of resting calcium concentration in rat ventricular myocytes. *J. Physiol.* *515* ( Pt 1), 109-118.

Choquette, D., Hakim, G., Filoteo, A.G., Plishker, G.A., Bostwick, J.R., and Penniston, J.T. (1984). Regulation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *125*, 908-915.

Christensen, K.A., Myers, J.T., and Swanson, J.A. (2002). pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* *115*, 599-607.

Churchill, G.C., Okada, Y., Thomas, J.M., Genazzani, A.A., Patel, S., and Gaglione, A. (2002). NAADP mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell* *111*, 703-708.

Clarke, D.D., and Sokoloff, L. (1999). *Circulation and Energy Metabolism of the Brain*.

Clarke, C.J., Snook, C.F., Tani, M., Matmati, N., Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2006). The extended family of neutral sphingomyelinases. *Biochemistry*

(Mosc.) *45*, 11247-11256.

Clarke, C.J., Guthrie, J.M., and Hannun, Y.A. (2008). Regulation of neutral sphingomyelinase-2 (nSMase2) by tumor necrosis factor- $\alpha$  involves protein kinase C- $\delta$  in lung epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* *74*, 1022-1032.

Cognato, G.P., Agostinho, P.M., Hockemeyer, J., Müller, C.E., Souza, D.O., and Cunha, R.A. (2010). Caffeine and an adenosine A(2A) receptor antagonist prevent memory impairment and synaptotoxicity in adult rats triggered by a convulsive episode in early life. *J. Neurochem.* *112*, 453-462.

Conradi, N.G., Sourander, P., Nilsson, O., Svennerholm, L., and Erikson, A. (1984). Neuropathology of the Norrbottnian type of Gaucher disease. Morphological and biochemical studies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *65*, 99-109.

Conzelmann, E., and Sandhoff, K. (1983). Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev. Neurosci.* *6*, 58-71.

Cooper, A.J., and Kristal, B.S. (1997). Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* *378*, 793-802.

Cornford, E.M., Diep, C.P., and Pardridge, W.M. (1985). Blood-brain barrier transport of valproic acid. *J. Neurochem.* *44*, 1541-1550.

Courtney, M.J., Lambert, J.J., and Nicholls, D.G. (1990). The interactions between plasma membrane depolarization and glutamate receptor activation in the regulation of cytoplasmic free calcium in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *10*, 3873-3879.

Crocker, A.C. (1961). The cerebral defect in Tay-Sachs disease and Niemann-Pick disease. *J. Neurochem.* *7*, 69-80.

Crocker, A.C., and Farber, S. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)* *37*, 1-95.

D'Ángelo, G., Polishchuk, E., Di Tullio, G., Santoro, M., Di Campi, A., Godi, A., West, G., Bielawski, J., Chuang, C.-C., van der Spoel, A.C., et al. (2007). Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* *449*, 62-67.

Dardis, A., Zampieri, S., Filocamo, M., Burlina, A., Bembi, B., and Pittis, M.G. (2005). Functional in vitro characterization of 14 SMPD1 mutations identified in Italian patients affected by Niemann Pick Type B disease. *Hum. Mutat.* *26*, 164.

Deacon, R.M.J., Bannerman, D.M., Kirby, B.P., Croucher, A., and Rawlins, J.N.P. (2002). Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav. Brain Res.* *133*, 57-68.

Dean, W.L., Chen, D., Brandt, P.C., and Vanaman, T.C. (1997). Regulation of platelet plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *272*, 15113-15119.

Dickson, R.C., Sumanasekera, C., and Lester, R.L. (2006). Functions and metabolism of sphingolipids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Lipid Res.* *45*, 447-465.

Dodge, J.C., Clarke, J., Song, A., Bu, J., Yang, W., Taksir, T.V., Griffiths, D., Zhao, M.A., Schuchman, E.H., Cheng, S.H., et al. (2005). Gene transfer of human acid sphingomyelinase corrects neuropathology and motor deficits in a mouse model



of Niemann-Pick type A disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17822-17827.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *8*, 1454-1468.

Duan, R.-D., Cheng, Y., Hansen, G., Hertervig, E., Liu, J.-J., Syk, I., Sjöstrom, H., and Nilsson, A. (2003). Purification, localization, and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase. *J. Lipid Res.* *44*, 1241-1250.

Duchen, M.R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol.* *516 ( Pt 1)*, 1-17.

Dulhunty, A.F. (2006). Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *33*, 763-772.

Dusart, I., Morel, M.P., and Sotelo, C. (1994). Parasagittal compartmentation of adult rat Purkinje cells expressing the low-affinity nerve growth factor receptor: changes of pattern expression after a traumatic lesion. *Neuroscience* *63*, 351-356.

Eakin, T.J., Antonelli, M.C., Malchiodi, E.L., Baskin, D.G., and Stahl, W.L. (1995). Localization of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform PMCA3 in rat cerebellum, choroid plexus and hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *29*, 71-80.

Empson, R.M., Garside, M.L., and Knöpfel, T. (2007). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2 contributes to short-term synapse plasticity at the parallel fiber to Purkinje neuron synapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 3753-3758.

Falchetto, R., Vorherr, T., and Carafoli, E. (1992). The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *1*, 1613-1621.

Farfel-Becker, T., Vitner, E.B., Pressey, S.N.R., Eilam, R., Cooper, J.D., and Futerman, A.H. (2011). Spatial and temporal correlation between neuron loss and neuroinflammation in a mouse model of neuronopathic Gaucher disease. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1375-1386.

Fenrick, R., and Hiebert, S.W. (1998). Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J. Cell. Biochem. Suppl.* *30-31*, 194-202.

Forsythe, W.I., McKEOWN, E.F., and Neill, D.W. (1959). Three cases of Niemann Pick's disease in children. *Arch. Dis. Child.* *34*, 406-409.

Fournet, N., Garcia-Segura, L.M., Norman, A.W., and Orci, L. (1986). Selective localization of calcium-binding protein in human brainstem, cerebellum and spinal cord. *Brain Res.* *399*, 310-316.

Fowler, S. (1969). Lysosomal localization of sphingomyelinase in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* *191*, 481-484.

Fucile, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* *35*, 1-8.

Funato, K., and Riezman, H. (2001). Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J. Cell Biol.* *155*, 949-959.

Futerman, A.H., and Hannun, Y.A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* *5*, 777-782.

Futerman, A.H., and van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 554-565.

Gabandé-Rodríguez, E., Boya, P., Labrador, V., Dotti, C.G., and Ledesma, M.D. (2014). High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A. *Cell Death Differ.* *21*, 864-875.

Galvan, C., Camoletto, P.G., Cristofani, F., Van Veldhoven, P.P., and Ledesma, M.D. (2008). Anomalous surface distribution of glycosyl phosphatidyl inositol-anchored proteins in neurons lacking acid sphingomyelinase. *Mol. Biol. Cell* *19*, 509-522.

Gao, J., Yao, Y., and Squier, T.C. (2001). Oxidatively modified calmodulin binds to the plasma membrane Ca-ATPase in a nonproductive and conformationally disordered complex. *Biophys. J.* *80*, 1791-1801.

Gerlach, M., Ben-Shachar, D., Riederer, P., and Youdim, M.B. (1994). Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J. Neurochem.* *63*, 793-807.

Ginzburg, L., and Futerman, A.H. (2005). Defective calcium homeostasis in the cerebellum in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *J. Neurochem.* *95*, 1619-1628.

Gleichmann, M., and Mattson, M.P. (2011). Neuronal calcium homeostasis and dysregulation. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1261-1273.

Goldin, E., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Pentchev, P.G., and Brady, R.O. (1995). Cultured skin fibroblasts derived from patients with mucopolipidosis 4 are auto-fluorescent. *Pediatr. Res.* *37*, 687-692.

Gopinath, R.M., and Vincenzi, F.F. (1977). Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *77*, 1203-1209.

Graber, D., Salvayre, R., and Levade, T. (1994). Accurate differentiation of neuronopathic and nonneuronopathic forms of Niemann-Pick disease by evaluation of the effective residual lysosomal sphingomyelinase activity in intact cells. *J. Neurochem.* *63*, 1060-1068.

Grassmé, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* *276*, 20589-20596.

Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* *260*, 3440-3450.

Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J.F., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., et al. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* *459*, 55-60.

Guerini, D., García-Martin, E., Gerber, A., Volbracht, C., Leist, M., Merino, C.G., and Carafoli, E. (1999). The expression of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoforms in cerebellar granule neurons is modulated by Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* *274*, 1667-1676.

Halkidou, K., Gaughan, L., Cook, S., Leung, H.Y., Neal, D.E., and Robson, C.N. (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* *59*, 177-189.

Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* *59*, 1609-1623.

Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* *426*, 803-809.

Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 139-150.

Hanson, J.E., La, H., Plise, E., Chen, Y.-H., Ding, X., Hanania, T., Sabath, E.V., Alexandrov, V., Brunner, D., Leahy, E., et al. (2013). SAHA enhances synaptic function and plasticity in vitro but has limited brain availability in vivo and does not impact cognition. *PloS One* *8*, e69964.

Heine, C., Tyynelä, J., Cooper, J.D., Palmer, D.N., Elleder, M., Kohlschütter, A., and Bräulke, T. (2003). Enhanced expression of manganese-dependent superoxide dismutase in human and sheep CLN6 tissues. *Biochem. J.* *376*, 369-376.

Higley, M.J., and Sabatini, B.L. (2008). Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron* *59*, 902-913.

Hilgemann, D.W., and Ball, R. (1996). Regulation of cardiac Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> exchange and KATP potassium channels by PIP<sub>2</sub>. *Science* *273*, 956-959.

Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronson, R.T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., and Funk, C.D. (1997). Mice Deficient in Cellular Glutathione Peroxidase Develop Normally and Show No Increased Sensitivity to Hyperoxia. *J. Biol. Chem.* *272*, 16644-16651.

Hockly, E., Richon, V.M., Woodman, B., Smith, D.L., Zhou, X., Rosa, E., Sathasivam, K., Ghazi-Noori, S., Mahal, A., Lowden, P.A.S., et al. (2003). Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 2041-2046.

Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G., and Stoffel, W. (2000). Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 5895-5900.

Hojjati, M.R., and Jiang, X.-C. (2006). Rapid, specific, and sensitive measurements of plasma sphingomyelin and phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* *47*, 673-676.

Holthuis, J.C.M., van Meer, G., and Huijtema, K. (2003). Lipid microdomains, lipid translocation and the organization of intracellular membrane transport (Review). *Mol. Membr. Biol.* *20*, 231-241.

Horinouchi, K., Erlich, S., Perl, D.P., Ferlinz, K., Bisgaier, C.L., Sandhoff, K., Desnick, R.J., Stewart, C.L., and Schuchman, E.H. (1995). Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat. Genet.* *10*, 288-293.

Ishibashi, Y., Kohyama-Koganeya, A., and Hirabayashi, Y. (2013). New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*,

1475-1485.

Jarrett, H.W., and Penniston, J.T. (1977). Partial purification of the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**, 1210-1216.

Jenkins, R.W., Canals, D., and Hannun, Y.A. (2009). Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell. Signal.* **21**, 836-846.

Jennings, J.J., Zhu, J.-H., Rbaibi, Y., Luo, X., Chu, C.T., and Kiselyov, K. (2006). Mitochondrial aberrations in mucopolidosis Type IV. *J. Biol. Chem.* **281**, 39041-39050.

Jeyakumar, M., Thomas, R., Elliot-Smith, E., Smith, D.A., van der Spoel, A.C., d'Ázzo, A., Perry, V.H., Butters, T.D., Dwek, R.A., and Platt, F.M. (2003). Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain J. Neurol.* **126**, 974-987.

Jiang, L., Bechtel, M.D., Galeva, N.A., Williams, T.D., Michaelis, E.K., and Michaelis, M.L. (2012). Decreases in plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in brain synaptic membrane rafts from aged rats. *J. Neurochem.* **123**, 689-699.

Jin, H.K., Carter, J.E., Huntley, G.W., and Schuchman, E.H. (2002). Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J. Clin. Invest.* **109**, 1183-1191.

Johansson, A.-C., Appelqvist, H., Nilsson, C., Kagedal, K., Roberg, K., and Ollinger, K. (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **15**, 527-540.

Jolly, R.D., Douglas, B.V., Davey, P.M., and Roiri, J.E. (1995). Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* **41 Suppl 2**, 283-295.

Jones, I., He, X., Katouzian, F., Darroch, P.I., and Schuchman, E.H. (2008). Characterization of common SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease and generation of mutation-specific mouse models. *Mol. Genet. Metab.* **95**, 152-162.

Kaech, S., and Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2406-2415.

Kelley, E.E., Khoo, N.K.H., Hundley, N.J., Malik, U.Z., Freeman, B.A., and Tarpey, M.M. (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 493-498.

Kikugawa, K., Kato, T., Beppu, M., and Hayasaka, A. (1989). Fluorescent and cross-linked proteins formed by free radical and aldehyde species generated during lipid oxidation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **266**, 345-356; discussion 357.

Kilsdonk, E.P., Yancey, P.G., Stoudt, G.W., Bangerter, F.W., Johnson, W.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J. Biol. Chem.* **270**, 17250-17256.

Kim, S.-J., Zhang, Z., Lee, Y.-C., and Mukherjee, A.B. (2006). Palmitoyl-protein

thioesterase-1 deficiency leads to the activation of caspase-9 and contributes to rapid neurodegeneration in INCL. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 1580-1586.

Kinsey, B.M., Kassis, A.I., Fayad, F., Layne, W.W., and Adelstein, S.J. (1987). Synthesis and biological studies of iodinated (127/125I) derivatives of rhodamine 123. *J. Med. Chem.* *30*, 1757-1761.

Kirkegaard, T., Roth, A.G., Petersen, N.H.T., Mahalka, A.K., Olsen, O.D., Moilanen, I., Zylicz, A., Knudsen, J., Sandhoff, K., Arenz, C., et al. (2010). Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* *463*, 549-553.

Koga, H., and Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy dysfunction in the pathogenesis of neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* *43*, 29-37.

Korkotian, E., Schwarz, A., Pelled, D., Schwarzmann, G., Segal, M., and Fu-terman, A.H. (1999). Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *J. Biol. Chem.* *274*, 21673-21678.

Kozel, P.J., Friedman, R.A., Erway, L.C., Yamoah, E.N., Liu, L.H., Riddle, T., Duffy, J.J., Doetschman, T., Miller, M.L., Cardell, E.L., et al. (1998). Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 2. *J. Biol. Chem.* *273*, 18693-18696.

Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B., and Krönke, M. (2006). Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J. Biol. Chem.* *281*, 13784-13793.

Kuo, T.H., Wang, K.K., Carlock, L., Diglio, C., and Tsang, W. (1991). Phorbol ester induces both gene expression and phosphorylation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *J. Biol. Chem.* *266*, 2520-2525.

Laste, G., Ripoll Rozisky, J., de Macedo, I.C., Souza Dos Santos, V., Custódio de Souza, I.C., Caumo, W., and Torres, I.L.S. (2013). Spinal cord brain-derived neurotrophic factor levels increase after dexamethasone treatment in male rats with chronic inflammation. *Neuroimmunomodulation* *20*, 119-125.

Latif, F., Duh, F.M., Gnarr, J., Tory, K., Kuzmin, I., Yao, M., Stackhouse, T., Modi, W., Geil, L., and Schmidt, L. (1993). von Hippel-Lindau syndrome: cloning and identification of the plasma membrane Ca(++)-transporting ATPase isoform 2 gene that resides in the von Hippel-Lindau gene region. *Cancer Res.* *53*, 861-867.

Ledesma, M.D., Brügger, B., Bünning, C., Wieland, F.T., and Dotti, C.G. (1999). Maturation of the axonal plasma membrane requires upregulation of sphingomyelin synthesis and formation of protein-lipid complexes. *EMBO J.* *18*, 1761-1771.

Lemercier, C., Brocard, M.-P., Puvion-Dutilleul, F., Kao, H.-Y., Albagli, O., and Khochbin, S. (2002). Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* *277*, 22045-22052.

Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 1125-1136.

Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* *327*, 46-50.

Lingwood, D., Kaiser, H.-J., Levental, I., and Simons, K. (2009). Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 955-960.

Liu, P., and Anderson, R.G.W. (1995). Compartmentalized Production of Ceramide at the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* *270*, 27179-27185.

Lloyd-Evans, E., and Platt, F.M. (2011). Lysosomal Ca(2+) homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell Calcium* *50*, 200-205.

Lloyd-Evans, E., Pelled, D., Riebeling, C., Bodennec, J., de-Morgan, A., Waller, H., Schiffmann, R., and Futerman, A.H. (2003). Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *J. Biol. Chem.* *278*, 23594-23599.

Lloyd-Evans, E., Morgan, A.J., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., and Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* *14*, 1247-1255.

Lu, K.P., and Means, A.R. (1993). Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr. Rev.* *14*, 40-58.

Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D.Y., Lonser, R.R., Brady, R.O., and Zhuang, Z. (2011). Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 21200-21205.

Lushchak, V.I. (2012). Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids* *2012*, 736837.

Luthi-Carter, R., Strand, A., Peters, N.L., Solano, S.M., Hollingsworth, Z.R., Menon, A.S., Frey, A.S., Spektor, B.S., Penney, E.B., Schilling, G., et al. (2000). Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1259-1271.

Lyons, M.R., and West, A.E. (2011). Mechanisms of specificity in neuronal activity-regulated gene transcription. *Prog. Neurobiol.* *94*, 259-295.

Macauley, S.L., Sidman, R.L., Schuchman, E.H., Taksir, T., and Stewart, G.R. (2008). Neuropathology of the acid sphingomyelinase knockout mouse model of Niemann-Pick A disease including structure-function studies associated with cerebellar Purkinje cell degeneration. *Exp. Neurol.* *214*, 181-192.

Maceyka, M., and Spiegel, S. (2014). Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* *510*, 58-67.

Di Malta, C., Fryer, J.D., Settembre, C., and Ballabio, A. (2012). Astrocyte dysfunction triggers neurodegeneration in a lysosomal storage disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E2334-E2342.

Marchesini, N., and Hannun, Y.A. (2004). Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *82*, 27-44.

Mata, A.M., Berrocal, M., and Sepúlveda, M.R. (2011). Impairment of the activity of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 819-822.

Mattiasson, G., Friberg, H., Hansson, M., Elmér, E., and Wieloch, T. (2003). Flow cytometric analysis of mitochondria from CA1 and CA3 regions of rat hippocampus reveals differences in permeability transition pore activation. *J. Neurochem.* *87*, 532-544.

Meldolesi, J. (2002). Rapidly exchanging Ca(2+) stores: ubiquitous partners of surface channels in neurons. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* *17*, 144-149.

Merrill Jr., A.H., and Sandhoff, K. (2002). Chapter 14 Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In *New Comprehensive Biochemistry*, J.E.V. Dennis E. Vance, ed. (Elsevier), pp. 373-407.

Michaelis, M.L., Johe, K., and Kitos, T.E. (1984). Age-dependent alterations in synaptic membrane systems for Ca<sup>2+</sup> regulation. *Mech. Ageing Dev.* *25*, 215-225.

Michaelis, M.L., Bigelow, D.J., Schöneich, C., Williams, T.D., Ramonda, L., Yin, D., Hühmer, A.F., Yao, Y., Gao, J., and Squier, T.C. (1996). Decreased plasma membrane calcium transport activity in aging brain. *Life Sci.* *59*, 405-412.

Miranda, S.R., Erlich, S., Friedrich, V.L., Haskins, M.E., Gatt, S., and Schuchman, E.H. (1998). Biochemical, pathological, and clinical response to transplantation of normal bone marrow cells into acid sphingomyelinase-deficient mice. *Transplantation* *65*, 884-892.

Miranda, S.R., Erlich, S., Friedrich, V.L., Gatt, S., and Schuchman, E.H. (2000a). Hematopoietic stem cell gene therapy leads to marked visceral organ improvements and a delayed onset of neurological abnormalities in the acid sphingomyelinase deficient mouse model of Niemann-Pick disease. *Gene Ther.* *7*, 1768-1776.

Miranda, S.R., He, X., Simonaro, C.M., Gatt, S., Dagan, A., Desnick, R.J., and Schuchman, E.H. (2000b). Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into niemann-pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 1988-1995.

Mitoma, J., Ito, M., Furuya, S., and Hirabayashi, Y. (1998). Bipotential roles of ceramide in the growth of hippocampal neurons: promotion of cell survival and dendritic outgrowth in dose- and developmental stage-dependent manners. *J. Neurosci. Res.* *51*, 712-722.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069-1075.

Mizutani, Y., Tamiya-Koizumi, K., Nakamura, N., Kobayashi, M., Hirabayashi, Y., and Yoshida, S. (2001). Nuclear localization of neutral sphingomyelinase 1: biochemical and immunocytochemical analyses. *J. Cell Sci.* *114*, 3727-3736.

Monteith, G.R., Wanigasekara, Y., and Roufogalis, B.D. (1998). The plasma membrane calcium pump, its role and regulation: new complexities and possibilities. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *40*, 183-190.

Morrison, J.H., and Hof, P.R. (2002). Chapter 37 Selective vulnerability of corticocortical and hippocampal circuits in aging and Alzheimer's disease. In *Progress in Brain Research*, J.D., Edward G. Jones, Pasko Rakic, Charles E. Ribak Efrain C. Azmitia, ed. (Elsevier), pp. 467-486.

Mullen, R.J., Buck, C.R., and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Dev. Camb. Engl.* *116*, 201-211.

Nayernia, Z., Jaquet, V., and Krause, K.-H. (2014). New insights on NOX enzymes in the central nervous system. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 2815-2837.

Neher, E., and Sakaba, T. (2008). Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron* *59*, 861-872.

Neyses, L., Reinlib, L., and Carafoli, E. (1985). Phosphorylation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *260*, 10283-10287.

Nichols, B. (2003). Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* *116*, 4707-4714.

Niggli, V., Adunyah, E.S., and Carafoli, E. (1981). Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* *256*, 8588-8592.

Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 295-322.

Nixon, R.A., Yang, D.-S., and Lee, J.-H. (2008). Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age. *Autophagy* *4*, 590-599.

O'Keefe J, and Nadel L (1978). Discrimination and maze learning. In *The Hippocampus as a Cognitive Map*, (Oxford University Press), pp. 265-291.

Okunade, G.W., Miller, M.L., Pyne, G.J., Sutliff, R.L., O'Connor, K.T., Neumann, J.C., Andringa, A., Miller, D.A., Prasad, V., Doetschman, T., et al. (2004). Targeted ablation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4. *J. Biol. Chem.* *279*, 33742-33750.

Olson, S., Wang, M.G., Carafoli, E., Strehler, E.E., and McBride, O.W. (1991). Localization of two genes encoding plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23. *Genomics* *9*, 629-641.

Olsson, T., Wieloch, T., and Smith, M.-L. (2003). Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Res.* *982*, 260-269.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552-565.

Otterbach, B., and Stoffel, W. (1995). Acid sphingomyelinase-deficient mice mimic the neurovisceral form of human lysosomal storage disease (Niemann-Pick disease). *Cell* *81*, 1053-1061.

Palacios, J., Sepúlveda, M.R., Salvador, J.M., and Mata, A.M. (2003). Effect of spermine on the activity of synaptosomal plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase reconstituted in neutral or acidic phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* *1611*, 197-203.

Pampols, T., Pineda, M., Girós, M.L., Ferrer, I., Cusi, V., Chabás, A., Sanmarti, F.X., Vanier, M.T., and Christomanou, H. (1999). Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *97*, 91-97.



Pang, Y., Zhu, H., Wu, P., and Chen, J. (2005). The characterization of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett.* **579**, 2397-2403.

Passini, M.A., Macauley, S.L., Huff, M.R., Taksir, T.V., Bu, J., Wu, I.-H., Piepenhagen, P.A., Dodge, J.C., Shihabuddin, L.S., O’Riordan, C.R., et al. (2005). AAV vector-mediated correction of brain pathology in a mouse model of Niemann-Pick A disease. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **11**, 754-762.

Peleg, S., Sananbenesi, F., Zovoilis, A., Burkhardt, S., Bahari-Javan, S., Agis-Balboa, R.C., Cota, P., Wittnam, J.L., Gogol-Doering, A., Opitz, L., et al. (2010). Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice. *Science* **328**, 753-756.

Pelled, D., Lloyd-Evans, E., Riebeling, C., Jeyakumar, M., Platt, F.M., and Futerman, A.H. (2003). Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with N-butyldeoxynojirimycin. *J. Biol. Chem.* **278**, 29496-29501.

Peltonen, L., Savukoski, M., and Vesa, J. (2000). Genetics of the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 299-305.

Pereira, V.G., Gazarini, M.L., Rodrigues, L.C., da Silva, F.H., Han, S.W., Martins, A.M., Tersariol, I.L.S., and D’Almeida, V. (2010). Evidence of lysosomal membrane permeabilization in mucopolysaccharidosis type I: rupture of calcium and proton homeostasis. *J. Cell. Physiol.* **223**, 335-342.

Perucca, E. (2002). Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* **16**, 695-714.

Pike, L.J. (2003). Lipid rafts bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* **44**, 655-667.

Pinto, F. de T., and Adamo, H.P. (2002). Deletions in the acidic lipid-binding region of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. A mutant with high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  resembling the acidic lipid-activated enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 12784-12789.

Pipalia, N.H., Cosner, C.C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., Farley, N., Helquist, P., Wiest, O., and Maxfield, F.R. (2011). Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5620-5625.

Pittis, M.G., Ricci, V., Guerci, V.I., Marçais, C., Ciana, G., Dardis, A., Gerin, F., Stroppiano, M., Vanier, M.T., Filocamo, M., et al. (2004). Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon. *Hum. Mutat.* **24**, 186-187.

Ramachandran, C.K., Murray, D.K., and Nelson, D.H. (1990). Dexamethasone increases neutral sphingomyelinase activity and sphingosine levels in 3T3-L1 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **167**, 607-613.

Ramsey, I.S., Delling, M., and Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 619-647.

Reddy, J.V., Ganley, I.G., and Pfeffer, S.R. (2006). Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling. *PloS One* **1**,

e19.

Reolon, G.K., Reinke, A., de Oliveira, M.R., Braga, L.M., Camassola, M., Andrades, M.E., Moreira, J.C.F., Nardi, N.B., Roesler, R., and Dal-Pizzol, F. (2009). Alterations in oxidative markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* *29*, 443-448.

Ricci, V., Stroppiano, M., Corsolini, F., Di Rocco, M., Parenti, G., Regis, S., Grossi, S., Biancheri, R., Mazzotti, R., and Filocamo, M. (2004). Screening of 25 Italian patients with Niemann-Pick A reveals fourteen new mutations, one common and thirteen private, in SMPD1. *Hum. Mutat.* *24*, 105.

Rice, M.E., and Russo-Menna, I. (1998). Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* *82*, 1213-1223.

Riessland, M., Ackermann, B., Förster, A., Jakubik, M., Hauke, J., Garbes, L., Fritzsche, I., Mende, Y., Blumcke, I., Hahnen, E., et al. (2010). SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1492-1506.

Rodriguez-Lafrasse, C., and Vanier, M.T. (1999). Sphingosylphosphorylcholine in Niemann-Pick disease brain: accumulation in type A but not in type B. *Neurochem. Res.* *24*, 199-205.

Rodríguez-Pascau, L., Gort, L., Schuchman, E.H., Vilageliu, L., Grinberg, D., and Chabás, A. (2009). Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. *Hum. Mutat.* *30*, 1117-1122.

Rose, C.R., and Ransom, B.R. (1997). Regulation of intracellular sodium in cultured rat hippocampal neurones. *J. Physiol.* *499 ( Pt 3)*, 573-587.

Rotolo, J.A., Zhang, J., Donepudi, M., Lee, H., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2005). Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 26425-26434.

Salvador, J.M., Inesi, G., Rigaud, J.L., and Mata, A.M. (1998). Ca<sup>2+</sup> transport by reconstituted synaptosomal ATPase is associated with H<sup>+</sup> countertransport and net charge displacement. *J. Biol. Chem.* *273*, 18230-18234.

Sandhoff, K., and Harzer, K. (2013). Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 10195-10208.

Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., and d'Ázzo, A. (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 500-511.

Sarna, J., Miranda, S.R., Schuchman, E.H., and Hawkes, R. (2001). Patterned cerebellar Purkinje cell death in a transgenic mouse model of Niemann Pick type A/B disease. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 1873-1880.

Sarnowska, A. (2002). Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathol. Assoc. Pol. Neuropathol. Med. Res.*

Cent. Pol. Acad. Sci. *40*, 101-106.

Sawai, H., Domae, N., Nagan, N., and Hannun, Y.A. (1999). Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso-platelet activating factor-phospholipase C. *J. Biol. Chem.* *274*, 38131-38139.

Scandroglio, F., Venkata, J.K., Loberto, N., Prioni, S., Schuchman, E.H., Chigorno, V., Prinetti, A., and Sonnino, S. (2008). Lipid content of brain, brain membrane lipid domains, and neurons from acid sphingomyelinase deficient mice. *J. Neurochem.* *107*, 329-338.

Schmidt-Kastner, R., and Freund, T.F. (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* *40*, 599-636.

Schuchman, E.H., Suchi, M., Takahashi, T., Sandhoff, K., and Desnick, R.J. (1991). Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *J. Biol. Chem.* *266*, 8531-8539.

Schuchman, E.H., Levran, O., Pereira, L.V., and Desnick, R.J. (1992). Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics* *12*, 197-205.

Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a004051.

Schwarz, A., and Futerman, A.H. (1997). Distinct roles for ceramide and glucosylceramide at different stages of neuronal growth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 2929-2938.

Sepúlveda, M.R., Hidalgo-Sánchez, M., and Mata, A.M. (2005). A developmental profile of the levels of calcium pumps in chick cerebellum. *J. Neurochem.* *95*, 673-683.

Sgambato-Faure, V., Xiong, Y., Berke, J.D., Hyman, S.E., and Strehler, E.E. (2006). The Homer-1 protein Ania-3 interacts with the plasma membrane calcium pump. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *343*, 630-637.

Shen, D., Wang, X., Li, X., Zhang, X., Yao, Z., Dibble, S., Dong, X., Yu, T., Lieberman, A.P., Showalter, H.D., et al. (2012). Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat. Commun.* *3*, 731.

Shen, J.-S., Meng, X.-L., Moore, D.F., Quirk, J.M., Shayman, J.A., Schiffmann, R., and Kanetski, C.R. (2008). Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol. Genet. Metab.* *95*, 163-168.

Shihabuddin, L.S., Numan, S., Huff, M.R., Dodge, J.C., Clarke, J., Macauley, S.L., Yang, W., Taksir, T.V., Parsons, G., Passini, M.A., et al. (2004). Intracerebral transplantation of adult mouse neural progenitor cells into the Niemann-Pick-A mouse leads to a marked decrease in lysosomal storage pathology. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 10642-10651.

Sikora, J., Pavlu-Pereira, H., Elleder, M., Roelofs, H., and Wevers, R.A. (2003). Seven novel acid sphingomyelinase gene mutations in Niemann-Pick type A and B patients. *Ann. Hum. Genet.* *67*, 63-70.

Simonaro, C.M., Desnick, R.J., McGovern, M.M., Wasserstein, M.P., and Schuch-

man, E.H. (2002). The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 1413-1419.

Simonaro, C.M., Park, J.-H., Eliyahu, E., Shtraizent, N., McGovern, M.M., and Schuchman, E.H. (2006). Imprinting at the SMPD1 locus: implications for acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Am. J. Hum. Genet.* *78*, 865-870.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* *387*, 569-572.

Simons, J.M., Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R., Van Dijk, H., and Labadie, R.P. (1990). Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic. Biol. Med.* *8*, 251-258.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131-1135.

Smith, E.L., and Schuchman, E.H. (2008). The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 3419-3431.

Sodero, A.O., Weissmann, C., Ledesma, M.D., and Dotti, C.G. (2011). Cellular stress from excitatory neurotransmission contributes to cholesterol loss in hippocampal neurons aging in vitro. *Neurobiol. Aging* *32*, 1043-1053.

Sohal, R.S., and Brunk, U.T. (1989). Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* *266*, 17-26; discussion 27-29.

Song, J., Noh, J.H., Lee, J.H., Eun, J.W., Ahn, Y.M., Kim, S.Y., Lee, S.H., Park, W.S., Yoo, N.J., Lee, J.Y., et al. (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *113*, 264-268.

Stahl, W.L., Eakin, T.J., Owens, J.W., Breininger, J.F., Filuk, P.E., and Anderson, W.R. (1992). Plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *16*, 223-231.

Stauffer, T.P., Guerini, D., and Carafoli, E. (1995). Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. A study using specific antibodies. *J. Biol. Chem.* *270*, 12184-12190.

Stauffer, T.P., Guerini, D., Celio, M.R., and Carafoli, E. (1997). Immunolocalization of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoforms in the rat brain. *Brain Res.* *748*, 21-29.

Steinert, S., Lee, E., Tresset, G., Zhang, D., Hortsch, R., Wetzels, R., Hebbard, S., Sundram, J.R., Kesavapany, S., Boschke, E., et al. (2008). A fluorescent glycolipid-binding peptide probe traces cholesterol dependent microdomain-derived trafficking pathways. *PloS One* *3*, e2933.

Strehler, E.E., and Zacharias, D.A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.* *81*, 21-50.

Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Caride, A.J. (2007). Plasma

membrane Ca<sup>2+</sup>-pumps. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 919-922.

Stumpf, W.E., Heiss, C., Sar, M., Duncan, G.E., and Craver, C. (1989). Dexamethasone and corticosterone receptor sites. Differential topographic distribution in rat hippocampus revealed by high resolution autoradiography. *Histochemistry* *92*, 201-210.

Tabas, I. (1999). Secretory sphingomyelinase. *Chem. Phys. Lipids* *102*, 123-130.

Tafesse, F.G., Ternes, P., and Holthuis, J.C.M. (2006). The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* *281*, 29421-29425.

Tani, M., and Hannun, Y.A. (2007). Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization. *J. Biol. Chem.* *282*, 10047-10056.

Tomiuk, S., Zumbansen, M., and Stoffel, W. (2000). Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* *275*, 5710-5717.

Tommasino, C., Marconi, M., Ciarlo, L., Matarrese, P., and Malorni, W. (2015). Autophagic flux and autophagosome morphogenesis require the participation of sphingolipids. *Apoptosis* *20*, 645-657.

Trovo, L., Van Veldhoven, P.P., Martín, M.G., and Dotti, C.G. (2011). Sphingomyelin upregulation in mature neurons contributes to TrkB activity by Rac1 endocytosis. *J. Cell Sci.* *124*, 1308-1315.

Turens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* *552*, 335-344.

Varga, K., Pászty, K., Padányi, R., Hegedûs, L., Brouland, J.-P., Papp, B., and Enyedi, A. (2014). Histone deacetylase inhibitor- and PMA-induced upregulation of PMCA4b enhances Ca<sup>2+</sup> clearance from MCF-7 breast cancer cells. *Cell Calcium* *55*, 78-92.

Da Veiga Pereira, L., Desnick, R.J., Adler, D.A., Disteché, C.M., and Schuchman, E.H. (1991). Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1—p15.4. *Genomics* *9*, 229-234.

Villa, A., Podini, P., Clegg, D.O., Pozzan, T., and Meldolesi, J. (1991). Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in chicken Purkinje neurons: differential distribution of the low affinity-high capacity Ca<sup>2+</sup> binding protein, calsequestrin, of Ca<sup>2+</sup> ATPase and of the ER luminal protein, Bip. *J. Cell Biol.* *113*, 779-791.

Villani, G.R.D., Di Domenico, C., Musella, A., Cecere, F., Di Napoli, D., and Di Natale, P. (2009). Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res.* *1279*, 99-108.

Vitner, E.B., Farfel-Becker, T., Eilam, R., Biton, I., and Futerman, A.H. (2012). Contribution of brain inflammation to neuronal cell death in neuronopathic forms of Gaucher's disease. *Brain J. Neurol.* *135*, 1724-1735.

Vornov, J.J., Park, J., and Thomas, A.G. (1998). Regional vulnerability to endogenous and exogenous oxidative stress in organotypic hippocampal culture. *Exp. Neurol.* *149*, 109-122.

Wan, T.C., Zabe, M., and Dean, W.L. (2003). Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 4b is phosphorylated on tyrosine 1176 in activated human platelets. *Thromb. Haemost.* *89*, 122-131.

Wanaverbecq, N., Marsh, S.J., Al-Qatari, M., and Brown, D.A. (2003). The plasma membrane calcium-ATPase as a major mechanism for intracellular calcium regulation in neurones from the rat superior cervical ganglion. *J. Physiol.* *550*, 83-101.

Wang, X., and Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. Aging Neurosci.* *2*, 12.

Wang, M.G., Yi, H., Hilfiker, H., Carafoli, E., Strehler, E.E., and McBride, O.W. (1994). Localization of two genes encoding plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases isoforms 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3p26->p25 and Xq28, respectively. *Cytogenet. Cell Genet.* *67*, 41-45.

Wang, X., Pal, R., Chen, X.-W., Limpeanchob, N., Kumar, K.N., and Michaelis, E.K. (2005). High intrinsic oxidative stress may underlie selective vulnerability of the hippocampal CA1 region. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *140*, 120-126.

Wei, H., Kim, S.-J., Zhang, Z., Tsai, P.-C., Wisniewski, K.E., and Mukherjee, A.B. (2008). ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 469-477.

Wilde, G.J., Pringle, A.K., Wright, P., and Iannotti, F. (1997). Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J. Neurochem.* *69*, 883-886.

Wong-Ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., and Monticelli, L. (2007). Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* *93*, 4225-4236.

Wu, K.D., Lee, W.S., Wey, J., Bungard, D., and Lytton, J. (1995). Localization and quantification of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* *269*, C775-C784.

Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., and Umeda, M. (1998). Lysenin, a novel sphingomyelin-specific binding protein. *J. Biol. Chem.* *273*, 5300-5306.

Zacharias, D.A., DeMarco, S.J., and Strehler, E.E. (1997). mRNA expression of the four isoforms of the human plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the human hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *45*, 173-176.

Zaidi, A., and Michaelis, M.L. (1999). Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Free Radic. Biol. Med.* *27*, 810-821.

Zaidi, A., Gao, J., Squier, T.C., and Michaelis, M.L. (1998). Age-related decrease in brain synaptic membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in F344/BNF1 rats. *Neurobiol. Aging* *19*, 487-495.

Zampieri, S., Mellon, S.H., Butters, T.D., Nevyjel, M., Covey, D.F., Bembi, B., and Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 3786-3796.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Zanni, G., Cali, T., Kalscheuer, V.M., Ottolini, D., Barresi, S., Lebrun, N., Montecchi-Palazzi, L., Hu, H., Chelly, J., Bertini, E., et al. (2012). Mutation of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 14514-14519.

Zhao, Y., Fan, X., Yang, F., and Zhang, X. (2004). Gangliosides modulate the activity of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase from porcine brain synaptosomes. *Arch. Biochem. Biophys.* *427*, 204-212.

Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.-P., and Göttlicher, M. (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* *5*, 455-463.

Zucker, R.S. (1999). Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* *9*, 305-313.

Zylinska, L., Guerini, D., Gromadzinska, E., and Lachowicz, L. (1998). Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* *1448*, 99-108.